

THESE
présentée à
la FACULTE DES SCIENCES de PARIS
pour obtenir
le grade de DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES
par

Claude ROZÉ

Pharmacien, Docteur en Médecine, Docteur 3e Cycle,
Maitre Assistant de Physiologie Cellulaire à la
Faculté des Sciences de Paris.

Sujet :

RECHERCHES SUR LA FIXATION DE L'EAU CELLULAIRE
PAR DES POLYMERES HYDROPHILES

Soutenue le 12 Mars 1969 Mars 1969 devant la Commission :

MM. J. André THOMAS
E, HOLLANDE
P. CARTIER
R. TURPIN,
Membre de l'Institut
C. DEBRAY

Président
Assesseur
Rapporteur

Invité
Invité

THESE
présentée à
la FACULTE DES SCIENCES de PARIS
pour obtenir
le grade de DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES
par

Claude ROZÉ

Pharmacien, Docteur en Médecine, Docteur 3e Cycle,
Maitre Assistant de Physiologie Cellulaire à la
Faculté des Sciences de Paris.

Sujet :

RECHERCHES SUR LA FIXATION DE L'EAU CELLULAIRE
PAR DES POLYMERES HYDROPHILES

Soutenue le Mars 1969 devant la Commission :

MM. J. André THOMAS	Président
E. HOLLANDE	Assesseur
P. CARTIER	Rapporteur
R. TURPIN,	
Membre de l'Institut	Invité
C. DEBRAY	Invité



UNIVERSITE DE PARIS
FACULTE DES SCIENCES DE PARIS

JANVIER 1967

PROFESSEURS

Le Doyen M. ZAMANSKY

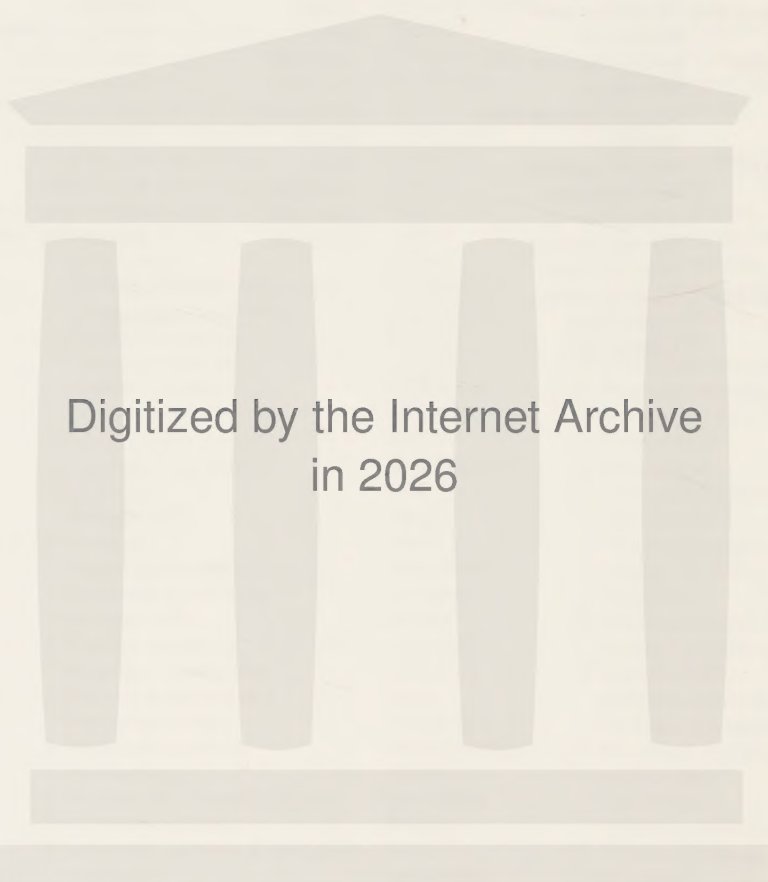
GRASSE	T Evolution des êtres organisés	CHOUARD	T Physiologie végétale
PREVOST	T Chimie organique	MALAVARD	T Aviation (technique aéronautique)
WYART	T Minéralogie & cristallographie	BRELOT	T Analyse supérieure
TEISSIER	T Zoologie	EICHHORN	T Botanique
AUGER	T Physique quantique & relativité	BENARD	T Chimie appliquée
MONNIER	T Physiologie générale	DUGUE	T Statistique mathématique
PIVETEAU	T Paléontologie	SOULAIRAC	T Psychophysiologie
ROCARD	T Physique E.N.S.	ULRICH	T Physiologie végétale appliquée
CARTAN	T Mathématique E.N.S.	KIRRMANN	T Théories chimiques
LAFFITTE	T Chimie générale	CHADEFAUD	T Botanique
N.....	T Géométrie supérieure	Mlle LE BRETON	T Physiologie de la nutrition
COULOMB	T Physique du globe	LELONG	T Application de l'analyse à la géométrie
CHRETIEN	T Chimie minérale		T Anatomie comparée
BOCQUET	T Zoologie	DEVILLERS	T Topologie algébrique
KASTLER	T Physique E.N.S.	EHRESMANN	T Physique SPCN
EPHROSSI	T Génétique	FRANCON	T Géographie physique, géologie dynamique
GAUTHERET	T Biologie végétale CPEM	GLANGEAUD	T Mathématiques MGP
LUCAS R.	Recherches physiques		T Techniques mathématiques de la physique
THOMAS A.	T Biologie	GODEMENT	T Géologie
MORAND	T Physique enseignement	PISOT	T Astrophysique
SOLEILLET	T Physique CPEM		T Géologie générale
FORTIER	T Mécanique expérimentale des fluides	ROCH	T Mathématiques générales
		SCHATZMANN	T Physique M. G. P.
DRACH	T Biologie maritime	TERMIER	T Géologie appliquée
QUENEY	T Météorologie & dynamique de l'atmosphère	ZAMANSKY	T Physique théorique
		LENNUIER	T Mathématiques M. P. C.
GALLIEN	T Embryologie	ROUTHIER	T Chimie générale
Mlle CAUCHOIS	T Chimie Physique	Mme TONNELAT	T Electrotechnique
THELLIER	T Physique du Globe	DIXMIER	T Chimie systématique
PONCIN	T Mécanique générale	SOUCHAY	T Physique théorique des hautes énergies
DUBREIL	T Arithmétique & Théorie des nombres	AIGRAIN	T Chimie biologique
		BRUSSET	T Biologie végétale CPEM
CAGNIARD	T Géophysique appliquée	LEVY	T Chimie générale I
CHAMPETIER	T Chimie macromoléculaire		T Synthèse organique
CUVILLIER	T T Micropaléontologie	Mme CHAIX	T Théories physiques
TRILLAT	Microscopie & diffraction électronique	Mme HUREL PY	T Physique électricité
		PANNETIER	T Chimie organique physique
WIEMANN	T Chimie organique & structurale	NORMANT	T Zoologie E.N.S.
VASSY	T Physique de l'atmosphère	YVON	T Energétique générale
DESTOUCHES	T Théorie physique	COTTE	T Mécanique appliquée
AMIEL	T Chimie générale	DUBOIS J.E.	T Chimie physique
J.P. MATHIEU	T Physique optique	LAMOTTE	T Physique atomique
COUTEAUX	T Cytologie	OLMER	T Physiologie comparée
CHOUQUET	T Théorie des fonctions & topologie	GAUTHIER	T Physiologie végétale
FELDMANN	T Biologie végétale marine	BARCHEWITZ	T Minéralogie et cristallographie
JOST	T Physiologie comparée	BROSSEL	
FORTET	T Calcul des probabilités & physique mathématique	BUSER	
		CAMUS	
SCHWARTZ	T Calcul différentiel & intégral	CURIEN	

POSSOMPES	T Zoologie	AUBOUIN	T Géologie
FULLMANN	T Chimie quantique	Mme BENOIT-GUEUTAL	T Physique nucléaire & radioactivité
TEILLAC	T Physique nucléaire & radioactivité		
VILLE	T Econométrie	BOUGIS	Biologie végétale marine Villefranche s/mer
FREYMANN	T Recherches physiques	RIGAUDY	T Chimie SPCN
ROLLET	T Chimie minérale	COLLONGUES	T Chimie appliquée
Mlle JOSIEN	T Chimie SPCN	DUBERT	Biochimie
CHEVALLEY	T Géométrie algébrique & théorie des groupes	NOZIERES	T Physique fondamentale
		CADIOT	Chimie organique
GERMAIN	T Mécan. Théo. des fluides	IVANOFF	T Océanographie physique
LUCAS G.	T Géologie	FRANCOIS	Zoologie
BERTHELOT	T Physique des particules fondamentales	TALBOT	Génie chimique
BRICARD	T Météorologie	Mme NOUGAREDE	Botanique
Mme ALBE-FESSARD	T Psycho-physiologie	BRUHAT	T Mathématiques MPC
M. JULIA	T Etude des molécules naturelles complexes	FOURNET	Electricité générale
MAGAT	T Physico-chimie des rayonnements	DEHEUELS	T Mathématiques propédeutique
MONOD	T Chimie du métabolisme	FURON	T Géologie SPCN
BRUN	T Mécanique des fluides I	Mme GANS	T Génétique
Mme DUBREIL	T Mathématiques (Agrégation)	GENEVES	Biologie végétale CPEM
Mme LELONG	T Mathématiques II E, N, S.	HUPE	T Pétrographie
BELLAIR	T Géologie S, P, C, N.	HOLLANDE	T Biologie générale
BOUSSIÈRES	T Radiochimie	LIONS	T Analyse numérique
Mme COUTURE	T Thermodynamique & mécanique	MAITTE	T Chimie organique
FRANC	Biologie animale CPEM	NICOLAS	Géologie appliquée
SCHNELL	T Botanique tropicale	PANIGEL	Biologie générale
STOLKOWSKI	T Physiologie générale	RAVIER	T Pétrographie
ACHER	T Chimie biologique	MOREL F	T Physiologie comparée
BAUDOIN	T Biologie animale CPEM	ROSEAU	T Mécanique théorique des fluides
BEAUMONT	Biologie animale SPCN	ROUBINE	T Electronique E, S, E.
BLAMONT	Géophysique ionosphère	SILBER	T Chimie CPEM
BOUREAU	T Botanique	UEBERSFELD	T Electronique
CURIE D.	Physique MGP	THIRY	T Mécanique céleste
DURAND DELGA	T Géologie	ABELES	T Physique SPCN
HELLER	T Physiologie végétale	AMAT	T Thermodynamique
TORTRAT	T Calcul des probabilités	BALKANSKI	Physique M, P, C, 1
CAILLEUX	T Géologie SPCN	LE CORRE	T Electricité
MAGNAN	T Physique électricité	NATAF	T Physique nucléaire & radioactivité
DAUDEL	T Mécanique ondulatoire	ECHALIER	Biologie animale CPEM
Mme CHOQUET	T Mécanique analytique :	BARRAUD	T Physique CPEM
BRUHAT	mécanique céleste	DARS	Géologie structurale & appliquée
Mlle VEIL	T Physiologie générale	CAMEFORT	Botanique (agrégation)
LWOFF	T Microbiologie	VICHNIEWSKY	T Mécanique industrielle
SIESTRUNCK	T Mécan. Phys. & expérimentale	SIGWALT	Chimie SPCN
CABANNES	T Mécanique théorique	BLAQUIERE	Automatique
CAIRE	T Géographie physique & géologie. dynamique	BARUCH	Physique propédeutique
		ARNOUS	T Physique théorique
COMOLET	T Mécanique des fluides	SLONINSKI	Génétique
DELLOUE	T Physique de l'exosphère	MALLIAVIN	T Mathématiques propédeutique
HOUILLON	T Biologie animale	GAUDEMAR	Chimie propédeutique
OLIVIER	T Anthropologie	BROUSSE	T Mécanique théorique
SAMUEL	T Mathématiques (ENS Jeunes filles)	ROSCH	T Astronomie
DE POSSEL	T Analyse numérique	GUY	T Physique expérimentale
CHARLOT	T Chimie analytique	LAZARD	T Mathématiques MPC
CHATELET	T Chimie CPEM	MOREL P.	Physique MPC
MATTIER	T Physique SPCN	ARSAC	Programmation
		LEFEBVRE	T Chimie MPC

BOK	Physique fondamentale	BUVET	Chimie CPEM
CHAPEVILLE	Biochimie	AUTHIER	Minéralogie et cristallographie
BENOIT	Physique CPEM	BONNEFILLE	Electrotechnique
RIO	Chimie CPEM	Mme PUISEUX DAO	Biologie végétale
JAUZEIN	Géologie ENS	BERGER	T Géométrie supérieure
PREVOST G.	Biologie cellulaire	Mlle LIBERMANN	T Mathématiques
FAVARD P.	Biologie animale CPEM	DEDONDER	T Biologie cellulaire
Mme CARNIAUX-COTTON		DUFOUR	T Electronique I, U, T.
	Evolution des êtres organisés	SCHAAL	Chimie CPEM
Mlle FICINI	Chimie CPEM	BAUCHOT	Anatomie comparée
LEQUEUX	Astronomie	LANCE	BV CPEM
COHEN TANNODJI	Physique atomique	GIRAUD	Botanique E. N. S.
HERVE	T Mathématiques	HULIN	Physique P C
Mme PECKER-WIMEL	T Astrophysique	VIGIER	Génétique
TAVERNIER	Physique PC	GUERN	Biologie végétale
DURAND Michel	Biologie animale SPCN	SLODZIAN	Physique CPEM
PASCAUD	Physiologie	LACOMBE	Logique mathématique
Mme PETIT	Biologie animale CPEM	TAVLITZKI	Biologie cellulaire
CAGNAC	Electricité	ARVIEU	Physique CPEM
FALK-VAIRANT	Physique nucléaire	TAXI	B. A. CPEM
KRASNER	T Mathématiques	COLLENOT	B. A. CPEM
BENZECRI	T Statistiques	BASSELIER	Chimie propédeutique
VINH MAU	Physique M. G. P.	BADOUAL	Electronique I, UT
DUQUESNES	Physique CPEM		
SCHUTZENBERGER T	Programmation		
TREMOLLON	Chimie MPC		
FAYARD	Chimie MPC		

Le Secrétaire Général

R. POUILLAIN



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A Monsieur le Professeur J. André THOMAS,
Professeur à la Faculté des Sciences de Paris,
Membre de l'Académie de Médecine

qui nous a accueilli dans son laboratoire dès 1962 et nous a fait profiter de son enseignement et de son exemple. Il nous a guidé et orienté inlassablement, dessinant le cadre de notre recherche et élargissant ses perspectives avec une grande hauteur de vues.

Il a bien voulu accepter de présider notre jury ; nous le prions de trouver ici l'expression de notre respectueuse et affectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Professeur André HOLLANDE,
Professeur à la Faculté des Sciences de Paris,

qui nous a fait profiter par son enseignement de sa
grande expérience de cytologiste. Sa présence à notre
jury est un gage de sympathie dont nous lui sommes
très reconnaissant.

A Monsieur le Professeur Pierre CARTIER,
Professeur à la Faculté de Médecine de Paris,

qui nous a grandement aidé de ses précieux conseils,
et qui a bien voulu siéger au jury de cette thèse.
Nous le prions d'agréer nos très sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Raymond TURPIN,
Professeur à la Faculté de Médecine de Paris,
Membre de l'Institut et de l'Académie de Médecine,

qui nous a fait le grand honneur d'accepter de participer
à notre jury de thèse, en gage de reconnaissance
et de profond respect.

A Monsieur le Professeur Charles DEBRAY,
Professeur à la Faculté de Médecine de Paris.

Voici dix ans, il nous ouvrait les portes de son laboratoire
et nous initiait à nos premiers travaux de recherche à la
Faculté de Médecine. Au cours de ces années, son aide
chaleureuse n'a cessé de se manifester et c'est grâce à
son soutien constant que ce travail a pu trouver son com-
plet développement. Qu'il soit assuré de notre fidélité
et de notre profonde reconnaissance.

A Monsieur Charles VAILLE,

qui par ses conseils quotidiens nous a soutenu et encouragé avec un intérêt toujours renouvelé. Son ardeur et sa foi pour la recherche nous ont permis de surmonter les moments difficiles, et nous souhaitons que cette collaboration puisse se prolonger longtemps. En témoignage de notre affectueuse gratitude et de notre attachement.

A tous ceux qui, par leur précieuse collaboration, ont permis la réalisation de ce travail, et en particulier : le Docteur Etienne MARTIN, qui nous a fait bénéficier de sa grande expérience dans le domaine de l'Anatomie Pathologique ; Etienne HOLLANDE et toute l'équipe de microscopie électronique du laboratoire de Biologie Cellulaire, qui nous ont inculqué les premiers rudiments des techniques d'étude des infrastructures ; Jacques CHARLOT, qui a activement collaboré à la mise au point de certains dosages biochimiques ; Mlle Maddy SOUCHARD, qui nous a apporté son aide toujours efficace pour l'organisation de nos expériences ; Mlles L. SALEZ et M. F. RIGARD pour leur précieuse collaboration technique ; Mlle G. JUDET, qui a peiné sur les nombreuses frappes du manuscrit.

Qu'ils en soient tous remerciés; sans eux, ce travail ne serait pas.

A la mémoire de ma mère.

A ma femme,

A mes enfants,

A tous les miens.

RECHERCHES SUR LA FIXATION DE
L'EAU CELLULAIRE PAR DES
POLYMERES HYDROPHILES.

SOMMAIRE

I - <u>INTRODUCTION</u>	1
CHAPITRE I - <u>MATERIELS ET PRINCIPES DES METHODES</u>	5
CHAPITRE II - <u>ETUDE DES POLYMERES UTILISES</u>	9
I - <u>Propriétés physico-chimiques</u>	9
A - Polyoxyéthylène-glycols	9
B - Pluronic	11
C - Polyvinylpyrrolidones	14
II - <u>Propriétés biologiques</u>	17
A - Polyoxyéthylène-glycols	17
B - Pluronic	21
C - Polyvinylpyrrolidones	23
III - <u>Contrôles physico-chimiques personnels</u>	24
A - Teneur en eau	24
B - Détermination du poids moléculaire moyen	25
1 - Viscosimétrie	25
2 - Tonométrie	26
3 - Cryoscopie	29
4 - Chromatographie	29
5 - Discussion	30
C - Dosage du sodium et du potassium	31
CHAPITRE III - <u>INTERACTION DES POLYMERES AVEC L'EAU, LES IONS ET LES PROTEINES ENZYMATIQUES</u>	33
I - <u>Formation de gels in vitro</u>	33
A - Technique	33
B - Résultats	33
II - <u>Action sur l'activité de l'ion sodium in vitro</u>	39
A - Technique	39
B - Résultats	42
C - Discussion	42
III - <u>Action sur des systèmes enzymatiques in vitro</u>	45

CHAPITRE IV - <u>ACTION DES POLYMERES SUR LES HEMATIES</u>	47
I - <u>Résistance globulaire en présence des polymères</u>	47
A - Techniques	47
B - Résultats	48
1 - Hémolyse en solutions pures de polymères	48
2 - Hémolyse en solutions mixtes polymères/CINa	50
3 - Relations entre point d'hémolyse 50 p. cent et abaissements cryométriques des solutions	57
II - <u>Variations de volume en solutions mixtes de polymères et de chlorure de sodium</u>	63
A - Technique	63
B - Résultats	63
III - <u>Relations entre volume cellulaire et seuil d'hémolyse</u>	74
IV - <u>Hémolyse en présence de saponine</u>	78
V - <u>Hémolyse en présence de lysocithine</u>	81
VI - <u>Tentatives de protection contre la congélation</u>	82
VII - <u>Action sur les récepteurs mucoprotéiques de la membrane</u>	82
VIII - <u>Discussion</u>	
a - Action hémolytique des surfactifs	83
b - Action d'autres polymères sur la charge et la surface des hématies	84
c - Interaction avec les protéines	85
d - Congélation	85
e - Polymères et fixation cellulaire des virus	87
CHAPITRE V - <u>ACTION DES POLYMERES SUR LES ORGANES ISOLES</u>	89
I - <u>Motricité du muscle lisse isolé</u>	89
A - Technique	89
B - Résultats : duodénum du Rat	93
1 - Action sur les mouvements spontanés	93
2 - Action sur les contractions provoquées par l'acétylcholine et le chlorure de baryum	95
C - Résultats : duodénum du Lapin	97
1 - Action sur les mouvements spontanés	97
2 - Action sur les contractions provoquées par l'acétylcholine	97
D - Discussion	98
II - <u>Action sur la conduction de l'influx dans le nerf isolé</u>	100
A - <u>Techniques</u>	100
B - <u>Résultats</u>	102
1 - Evolution des paramètres mesurés chez les nerfs témoins	102
2 - Action des polymères	115
C - <u>Discussion</u>	115
1 - Matériel	115
2 - Manoeuvres expérimentales	116
3 - Conservation	116
4 - Mécanisme d'action	118
5 - Comparaison avec d'autres agents bloquant la conduction	118

CHAPITRE VI - <u>ACTION DES POLYMERES SUR LE DEBIT BILIAIRE ET L'EXCRETION DE LA BILIRUBINE</u>	125
A - <u>Techniques</u>	125
1 - Appareillage	125
2 - Conduite de l'expérience	126
3 - Dosage de la bilirubine	126
B - <u>Résultats</u>	129
1 - Action sur le débit biliaire	129
2 - Action sur l'excrétion de la bilirubine	132
C - <u>Discussion</u>	132
1 - Action sur le débit biliaire	132
a - Rappel des mécanismes de la sécrétion biliaire	146
b - Hypothèses concernant le mode d'action des polymères	149
2 - Excrétion de la bilirubine	150

CHAPITRE VII - <u>ACTION DES POLYMERES SUR L'OXALOSE RENALE EXPERIMENTALE DU RAT</u>	
I - <u>Techniques</u>	151
A - Protocoles expérimentaux	151
B - Techniques d'exploitation des résultats	152
C - Techniques histologiques	152
II - <u>Résultats</u>	
A - Données biologiques	153
B - Données histologiques	159
1 - Rappel de la structure du rein chez le Rat normal	159
2 - Les lésions dans la néphrite à l'éthylène-glycol du Rat	183
3 - Les lésions par les polymères seuls et dans les associations avec l'éthylène-glycol	185
III - <u>Discussion</u>	
A - Reproductibilité technique	200
B - Structure et mécanisme des lésions par l'éthylène-glycol	204
C - Comparaison avec d'autres lésions de calcification rénale	206
D - Le rôle de l'ion calcium dans les lésions dues à l'éthylène-glycol	207
1 - Organisation de l'expérience	208
2 - Résultats	208
3 - Discussion	211
E - Spécificité des lésions rénales pbtenués par les polymères	212
F - Comparaison avec d'autres polymères	217
1 - Résultats personnels	217
2 - Données de la littérature	218
G - Les lésions de néphrose osmotique - Infrastructure et participation des organelles	223
H - Les lésions rénales sont-elles une thésaurimose ?	227
I - Rôle de la charge des polymères	228
J - Fixation et ultrastructure des cellules tubulaires proximales	229

K - Le problème des inclusions cristallines intra-corporelles	231
CHAPITRE VIII - <u>DISCUSSION GENERALE</u>	
I - <u>Etablissement d'un tableau général des effets</u>	235
II <u>Structure de l'eau dans les systèmes biologiques</u>	237
III <u>Les modifications structurales de l'eau, hypothèse pour un mode d'action unitaire des polymères</u>	241
IV <u>Rôle d'autres facteurs dans l'effet des polymères</u>	250
<u>RESUME ET CONCLUSIONS</u>	253
<u>ANNEXE</u>	257
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	I

INTRODUCTION

Certains polymères hydrophiles, lorsqu'ils sont injectés à l'animal, induisent des effets particuliers, sous la forme d'une sorte de toxicité potentielle, car non visible chez l'animal normal; celle-ci est susceptible d'être révélée par une agression organique qui modifie de quelque façon les défenses de l'organisme en le rendant vulnérable à ces corps potentiellement nocifs.

Nous avons d'abord décrit de tels phénomènes à propos de forts effets de potentialisation entre une substance toxique pour le rein, l'éthylène-glycol et un copolymère de l'oxyde d'éthylène et de l'oxyde de propylène (VAILLE, DEBRAY et Coll., 1962 a). L'analyse de ces expériences nous a amené à formuler l'hypothèse d'une action par l'intermédiaire d'un phénomène physique d'appel d'eau à la suite de la solvation du polymère. On aurait ainsi une sorte de blocage de l'eau, extracellulaire si le polymère ne pénètre pas la cellule, et de fixation intracellulaire dans le cas contraire.

Nous désignons par le terme de fixation une immobilisation partielle, autour des chaînes du polymère, d'un nombre appréciable de molécules d'eau, entraînant des modifications de la mobilité de ces molécules, et par là des modifications de leur pouvoir solvant, de la répartition des ions, etc... avec pour conséquences des modifications fonctionnelles dans les systèmes biologiques environnants. On peut concevoir qu'une telle immobilisation de l'eau puisse avoir des effets fort différents de ceux de l'hypertonie simple, telle qu'elle est obtenue avec de petites molécules. Nous nous sommes proposé d'étudier le problème des effets de la liaison de l'eau des systèmes vivants à des molécules exogènes, et de chercher si de telles expériences ne pourraient pas contribuer à une meilleure connaissance des états de l'eau dans l'organisme. Ce programme est sans doute ambitieux et il est certain que dans ce travail nous ne pourrions que dégager des voies préliminaires et évaluer l'intérêt de la poursuite de recherches ultérieures.

Il semble assuré que les propriétés tout à fait particulières de la molécule d'eau jouent un rôle fondamental dans la constitution de la matière vivante, et nous pouvons difficilement concevoir une autre substance, formée d'éléments chimiques connus, pouvant servir de base à un système vivant. Les éléments du tableau de Mendeleïeff étant les seuls présents dans tout l'univers visible, on peut dire avec une certaine sécurité qu'il n'y a pas de vie sans eau.

Malgré cette importance fondamentale, la structure intime de l'eau liquide, et surtout celle des solutions, reste encore un problème mal résolu pour les physico-chimistes, sans doute par suite de l'extrême mobilité des variétés structurales d'associations moléculaires qui peuvent se former dans les solutions. L'eau, molécule fortement polaire, s'associe très facilement avec les molécules voisines par des liaisons hydrogène plus ou moins labiles, en particulier si les particules voisines sont également des molécules d'eau. Il en résulte une organisation plus ou moins forte de la phase, dépendant de nombreux facteurs, et en particulier de la température et de la présence d'autres molécules.

Divers modèles de structure ont été proposés pour l'eau liquide, mettant en cause la présence d'amas moléculaires plus ou moins coordonnés, dont les molécules sont engagées dans une à quatre liaisons hydrogène, ou celle de réseaux cristallins à mailles larges, du type des clathrates (voir par ex. : SCHMITT, 1960, SAUNDERS et FLYNN, 1965).

On conçoit que l'introduction dans un tel milieu de molécules assez longues, possédant des groupements hydrophiles fortement polaires, et parfois d'autre groupements non polaires, puisse induire une réorganisation de la structure au voisinage de la chaîne du polymère, soit par augmentation de la structuration (caractéristique reconnue aux groupements hydrophobes comme ceux des hydrocarbures; FRANKS, 1965), soit par désorganisation de la structure, comme c'est souvent le cas pour les ions (SCHMITT, 1960). De plus, les molécules de polymères linéaires ont une configuration variable en solution ; on admet généralement qu'elles se présentent sous forme d'un peloton plus ou moins déroulé selon les conditions de température et d'environnement et une seule molécule de masse moyenne peut influencer une zone assez étendue si elle est sous forme relativement peu pelotonnée.

En fait, pour le biologiste, l'état de l'eau dans les solutions n'est qu'une étape préliminaire vers la connaissance des formes de l'eau intra-cellulaire, ce qui représente le point le plus important. Ici, interviennent les protéines et leur pouvoir d'hydratation qui se manifeste par la présence d'une fraction d'eau liée, ou non solvante, dont l'importance relative est sans doute influencée par divers facteurs, comme les ions, pouvant jouer un rôle dans les métabolismes (BERENDSEN et MIGCHELSEN, 1965 ; LING, 1965). Dans la cellule apparaissent en plus les nombreuses infrastructures membranaires sur lesquelles des effets d'orientation moléculaire mettent en jeu des forces sans doute importantes (LING et OCHSENFELD, 1966).

Finalement le problème central, que l'on est encore loin de pouvoir aborder sérieusement, est celui de l'eau du hyaloplasme.

Cette question, relativement peu connue, est d'une importance fondamentale. Dans toute cellule, les organelles baignent dans une phase continue soluble, constituant leur microenvironnement et dont le rôle est très vraisemblablement primordial dans tous les phénomènes de transmission et de communication.

La phase continue soluble, ou matrice cytoplasmique fondamentale, est encore assez peu étudiée, par suite du manque de techniques permettant d'aborder ce domaine (POLICARD, 1968). La simple mesure du volume réel de la phase soluble est déjà d'une grande difficulté ; seules des mesures portant sur des cellules vivantes et intactes donneraient quelques garanties d'exactitude (ainsi des expériences de centrifugation de cellules entières ont fourni des renseignements préliminaires, ZALOKAR, 1960). Sitôt que l'on a recours à des procédés d'homogénéisation et de rupture des cellules, il y a tout lieu de penser que des processus de dislocation des organelles et de mélange des phases interviennent, introduisant des causes d'erreur importante. Si de plus on cherche à opérer sur des tissus et non des cellules isolées, des interférences se produisent entre l'eau extra-cellulaire et les espaces liquidiens de la matrice fondamentale.

Autres aspects du problème, la viscosité et les propriétés rhéologiques de la matrice fondamentale sont fort peu connues, sauf dans certains organismes comme les amibes, particulièrement observés du point de vue des mouvements cytoplasmiques. Le rôle de grosses molécules orientées les une par rapport aux autres, sans doute polarisées par les structures voisines, ordonnant autour d'elles une atmosphère d'eau et d'ions hydratés, est sans doute fondamentale. On conçoit qu'une disruption par des moyens mécaniques des structures membranaires puisse du même coup détruire cette ordonnance et modifier complètement la structure moléculaire du hyaloplasme dans le broyat par rapport à son état réel in vivo.

Il est également vraisemblable que des polymères hydrophiles, s'ils sont amenés jusqu'au niveau du hyaloplasme (par des phénomènes de micro-pinocytose ou par une traversée membranaire directe), modifieront de façon significative les processus d'échange et de transfert des ions et des autres molécules dans la matrice fondamentale.

Soulignons cependant dès maintenant qu'un tel effet nécessite comme stade préliminaire la traversée membranaire, étape qui n'est pas toujours franchie. Dans certaines cellules particulières, comme les hématies, on peut estimer que l'expérimentation accède à une structure relativement proche de la matrice fondamentale, puisque les hématies adultes de mammifères sont pratiquement dépourvues de toute organelle intracellulaire. La forte quantité d'hémoglobine présente forme dans ces cellules un système tout à fait spécial, mais en dépit de cet inconvénient, le contenu cellulaire représente un modèle commode pour l'étude de la structuration de l'eau et de l'influence des agents structurants et destructurants. Certains auteurs, comme GOOD (1961), TRINSCHER (1964), ont particulièrement insisté sur ce point.

Nous avons ici cherché à étudier les modifications provoquées sur des structures biologiques par la présence de polymères exogènes capables d'interactions avec l'eau par formation de liaisons hydrogène.

Quelques réflexions sur ce problème nous ont amené à conclure qu'il n'était pas possible, compte tenu de nos compétences, des techniques dont nous disposons, de la difficulté des mesures de l'eau liée, d'aborder par des études directes ce phénomène de fixation de l'eau.

D'autre part, il paraît certain que l'étude d'un seul polymère ne peut pas conduire à des résultats interprétables, pour plusieurs raisons : d'abord une telle étude ne permettrait pas de conclure sur la généralité du phénomène ; ensuite il est peu vraisemblable qu'un polymère déterminé manifeste cet effet à l'état pur ; enfin, si par hasard cette substance existe, il est très improbable que nous l'ayons trouvée dès le départ.

L'effet d'un produit déterminé est la résultante de plusieurs actions primaires de types différents ; il peut être considéré comme une équation à plusieurs inconnues, qui ne peut être résolue lorsqu'elle est unique.

Nous avons donc décidé d'aborder le problème d'une manière indirecte, en recherchant dans des expériences diverses les arguments favorables et défavorables à l'hypothèse d'un blocage ou d'une modification de structuration de l'eau. La diversité a été obtenue dans deux domaines : d'une part, diversité des systèmes étudiés (organisme entier, organes isolés, cellules isolées, systèmes non vivants), d'autre part, diversité des polymères essayés.

Il est bien évident que les renseignements obtenus seront d'autant plus abondants que les substances essayées seront plus nombreuses, et une conclusion valable sur la généralité des phénomènes est à ce prix. D'un autre côté, nos moyens matériels ont des limites, et nous avons jugé sage, pour une première étude, de nous limiter à l'essai de trois polymères, préférant réaliser toujours des expériences parallèles pour ces trois corps, plutôt que d'allonger la liste et d'en faire une étude incomplète. Des résultats trouvés dans la littérature pourront en plus nous servir, mais, toujours fragmentaires, ils ne pourront éclairer que certaines facettes de la question.

Ces hypothèses préliminaires étant admises, le choix des polymères pose un problème d'une grande acuité ; s'il est mauvais il entraînera beaucoup d'essais inutiles et il sera impossible de le modifier en cours de travail sans enlever du même coup à toutes les expériences antérieures toute leur valeur comparative. Seul l'avenir dira si le choix a été bon. Quoi qu'il en soit, et compte tenu de ces risques, notre décision a été prise d'après les critères suivants : masse moléculaire de l'ordre de 5.000 à 10.000 (qui représente de toute façon un domaine peu exploré en raison des difficultés de mesure dans cette zone), forte solubilité dans l'eau, faible to-

xicité pour l'animal, présence ou absence de portions hydrophobes dans la molécule, aptitude plus ou moins forte à contracter des liaisons hydrogène avec les molécules voisines.

Les trois molécules retenues sont les suivantes : un polymère de l'oxyde d'éthylène et de l'oxyde de propylène (pluronic F-68), un polymère de l'oxyde d'éthylène (polyoxyéthylène glycol 6.000), une polyvinylpyrrolidone (P.V.P. 11.000).

Dans ce qui va suivre, nous nous efforcerons d'analyser dans chaque effet constaté la part qui peut être attribuée avec une confiance suffisante à des anomalies de la concentration ou du pouvoir solvant de l'eau, et la part revenant à d'autres mécanismes d'action, en particulier une fixation directe sur les membranes. La comparaison de divers produits dans des circonstances variées devrait permettre d'éliminer progressivement les actions particulières pour ne retenir qu'un schéma général du phénomène de base : l'immobilisation partielle des molécules d'eau.

CHAPITRE I

MATERIELS ET PRINCIPES DES METHODES

Notre intention est d'étudier les mouvements d'eau et des ions ainsi que les modifications de ces mouvements observés en présence de polymères hydrophiles. Nous avons donc choisi des techniques utilisées classiquement pour analyser les effets des agents dits "osmotiques". Dans ce qui va suivre, nous utiliserons ce terme, non dans son sens physique strict qui signifie "phénomène mesuré avec un osmomètre à membrane", mais pour désigner tout phénomène en accord quantitatif avec le nombre des particules présentes dans une solution. Nous nous efforcerons d'ailleurs d'éviter toute ambiguïté en précisant du mieux possible les méthodes de mesure employées dans chaque cas.

Le choix des techniques a également été déterminé par des critères pratiques. C'est ainsi que nous nous sommes limité aux méthodes qui nous semblaient abordables, compte-tenu de nos connaissances et de nos possibilités matérielles. Lorsqu'un choix était possible entre plusieurs voies d'accès, nous avons retenu celle qui nous était la plus familière.

Dans un ordre de complexification croissante, nous désirions étudier des systèmes physico-chimiques non vivants, des cellules isolées, des organes isolés, des organismes entiers. Le phénomène que nous abordons paraît très général et il est probable que des résultats révélateurs peuvent se manifester dans de très nombreux systèmes biologiques, pourvu que leur étude soit suffisamment fine. Il était donc essentiel de se limiter à des objets bien connus, sur lesquels les essais puissent être suffisamment précis. Les détails techniques spéciaux seront rapportés dans chaque chapitre ; nous n'indiquerons ici que les lignes générales du choix.

a) Systèmes non vivants: Nous avons d'abord tenté d'aborder une étude physico-chimique modeste des solutions de polymères, en recherchant essentiellement une divergence entre le nombre des particules présentes dans les solutions, autant qu'on peut l'estimer par le calcul d'après le poids moléculaire moyen, la dispersion des masses moléculaires et la présence des impuretés, et la mesure de grandeurs physiques théoriquement proportionnelles à la pression osmotique.

Nous nous sommes pour cela adressé à un contrôle des polymères par des méthodes mesurant classiquement le poids moléculaire: cryoscopie, viscosimétrie, tonométrie, dosage des groupements terminaux, que nous avons tenté de confronter entre elles pour en tirer des anomalies de comportement en solutions aqueuses. Des dosages de sodium, potassium, teneur en eau ont permis d'éliminer la présence accidentelle d'impuretés à doses massives qui auraient pu fausser fortement nos conclusions. Les méthodes physiques ne relevant pas directement de nos compétences, nous ne considérons leurs résultats que comme des valeurs approchées, destinées à tenter de combler partiellement le fossé qui sépare trop souvent la zone d'étude où les physiciens se meuvent avec confiance et la zone de travail des

biologistes. Entre ces deux domaines s'étend une région frontalière où les uns ni les autres n'osent se prononcer, craignant des erreurs et surtout une mauvaise compréhension, les langages et les formes d'esprit de ces disciplines étant foncièrement différentes.

Nous avons pris sciemment un risque d'erreur en essayant d'interpréter au moins avec bon sens des constatations faites dans ce domaine. Le risque nous paraît justifié, car nous sommes convaincu que c'est en parcourant délibérément les frontières interdisciplinaires que des progrès importants pourront être obtenus.

Les possibilités d'interactions fortes avec les ions ont été abordées in vitro par deux méthodes : formation de gels, et mesures d'activité par électrode à sodium. La formation de gels dans des mélanges polymères-sels minéraux traduit sans doute un phénomène de structuration moléculaire conduisant à la formation d'un réseau solide qui peut être rapproché à priori des variations de viscosité du hyaloplasme, bien que les conditions d'expérience soient totalement différentes ; de plus les relations de ce phénomène avec la température laissent supposer des rapports avec la structuration de l'eau liquide.

Les anomalies de concentration et de structuration de l'eau autour des chaînes de polymères doivent sans doute réagir sur la mobilité des ions et leurs propriétés en solution, qu'ils soient bloqués dans des zones de restructuration, ou qu'ils soient exclus de ces mêmes zones. Nous avons abordé la question en mesurant l'activité de l'ion sodium avec une électrode de verre perméable à cet ion, dans des solutions contenant des mélanges en proportions variables d'un sel de sodium et de polymères. Des notions sur les variations d'activité peuvent ainsi être obtenues.

b) Cellules isolées.

Pour étudier les mouvements de l'eau dans des cellules isolées, nous nous sommes adressé aux hématies, cellule test classique pour les études dans ce domaine. Leurs avantages essentiels sont la commodité de manipulation et la relative simplicité du modèle cellulaire qu'elles représentent, malgré les différences profondes du milieu interne de l'hématie avec le hyaloplasme fondamental d'une cellule moins spécialisée. Ce modèle permet d'aborder deux types de phénomènes : action sur le passage de l'eau à travers la membrane, et actions diverses sur la membrane elle-même, ces dernières ne représentant qu'un aspect parasite des effets des polymères, qu'il faut connaître quantitativement pour pouvoir le dissocier de l'effet sur l'eau elle-même.

L'action sur le passage de l'eau a été recherchée par des techniques étudiant l'hémolyse et visant à calculer les quantités d'électrolytes extra-cellulaires que peuvent remplacer les polymères. Pour cela, la résistance globulaire a été mesurée dans des solutions mixtes de ClNa et de polymères, et l'effet osmotique observé a été comparé avec les données de la cryoscopie et celles du calcul des pressions osmotiques d'après les lois valables pour les solutions idéales diluées.

Les effets sur la membrane sont étudiés en mettant en relation des mesures du volume cellulaire et des mesures du point d'hémolyse 50 % (H50) en présence de diverses concentrations des polymères. Cette méthode repose sur l'hypothèse suivante : si la membrane est modifiée (fragilisation ou consolidation), les hématies seront détruites lorsque leur volume atteindra une certaine valeur, différente de la valeur témoin. Si le volume est plus faible au point H50 chez les traités que chez les témoins, il y a fragilisation ; s'il est plus fort, il y a consolidation.

Ces vues sont peut être un peu trop simplifiées, car elles ne tiennent pas compte en particulier des variations éventuelles de forme des hématies ni de la quantité de plasma piégé entre les cellules, mais elles semblent pouvoir servir de base de départ. D'autres effets membranaires ont été recherchés en suivant l'action de produits hémolyants comme la saponine ou se fixant en certains sites de la membrane comme les myxovirus.

c) Organes isolés.

En sélectionnant ces préparations, nous avons cherché à explorer deux comportements fondamentaux des cellules vivantes, non trouvés dans le modèle précédent : motricité et excitabilité.

Pour la motricité, nous nous sommes adressé par commodité au muscle lisse intestinal du Rat et du Lapin ; le duodénum a été choisi, à la fois parce qu'il possède une motricité intrinsèque forte, et que c'est une préparation classique permettant des comparaisons faciles. Son activité motrice autonome permet de tester à la fois l'effet des polymères sur les mouvements spontanés, et l'action sur les contractions produites par des agents extrinsèques.

Pour l'excitabilité, le tissu nerveux était indiqué ; une préparation simple et robuste a été choisie : le sciatique de grenouille, nerf mixte périphérique facile à manipuler.

d) Passage de l'eau in vivo.

Pour l'étude des effets dus à la présence de molécules fortement hydrophiles sur le passage de l'eau dans un organe excréteur, nous avons choisi l'excrétion biliaire. Ce choix mérite d'être éclairci, car il pourrait paraître plus logique d'étudier l'excrétion rénale.

Cependant, l'action au niveau du rein sera abordée plus loin sous un autre angle, celui de la toxicité potentielle, et notre souci de diversité nous poussait dans une autre voie, tandis que des résultats partiels sont déjà trouvés dans la littérature (SHAFFER et Coll., 1948, KATIC et KOBINGER, 1962).

D'autre part, l'étude de l'élimination biliaire présente l'avantage d'aborder simultanément un autre phénomène, celui de l'hémolyse in vivo, qui doit permettre de recouper de façon intéressante les résultats obtenus sur les hématies in vitro et de contrôler leur valeur.

Enfin, notre orientation antérieure a fait que nous connaissons bien mieux les techniques d'étude de la sécrétion biliaire (ROZE, 1964b) que celles qui s'appliquent à la formation de l'urine.

e) Toxicité potentielle in vivo.

Pour aborder le rôle de l'eau dans les phénomènes de toxicité provoqués in vivo par les polymères, un modèle nous a été imposé, puisque les altérations rénales obtenues en associant des polymères hydrophiles et l'éthylène glycol sont le point de départ de ce travail et que jusqu'à présent il n'a pas été décrit de phénomènes du même type dans un autre organe.

Les recherches dans ce sens ont été cependant fort peu nombreuses, puisqu'en dehors de QUEVAUVILLER (1962) qui a défini sous le terme de pathopharmacodynamie la recherche des effets des drogues chez l'animal malade, bien peu d'auteurs se sont intéressés à cette question.

Nous avons défini avec la meilleure précision possible la technique de fragilisation de l'animal par une néphrite tubulaire à l'éthylène-glycol, qui représente notre outil de travail, et nous avons analysé avec soin cette méthode. Puis nous avons étudié la structure des lésions obtenues lors de l'introduction dans ce système des molécules de polymères, entraînant avec elle leur atmosphère d'eau, et nous avons essayé d'avancer des interprétations cohérentes avec les faits d'expérience.

Nous envisagerons donc successivement des expériences menées dans des domaines très différents. Cette diversité, volontairement recherchée pour explorer la généralité du phénomène, ne facilite pas l'exposé ; d'une part certains résultats ont été obtenus chronologiquement presque simultanément sur des préparations expérimentales différentes ; d'autre part, les techniques sont diverses et il semble illogique de les grouper. Aussi avons-nous choisi de rapporter successivement dans chaque chapitre la technique utilisée et les résultats, suivis d'une discussion partielle : celle-ci tentera d'estimer la confiance à accorder aux résultats décrits et les placera dans le

contexte formé par ceux de la littérature. Puis, dans une discussion générale, nous reprendrons dans un parallèle tous les phénomènes constatés avec les trois molécules qui nous ont servi de test, et nous essaierons, grâce à un tableau comparatif, d'en dégager quelques lois générales et quelques directions de recherche pour l'avenir.

Le plan choisi pour l'exposé n'est pas un plan chronologique ; c'est un plan logique, partant des effets les plus simples pour aller vers les effets les plus élaborés, dans un ordre de complexification croissante des expériences. Nous aborderons successivement les chapitres suivants :

- Présentation des polymères : propriétés physico-chimiques et biologiques sommaires ; contrôles effectués.
- Interaction avec l'eau et les ions : formation de gels in vitro ; action sur l'activité de l'ion sodium in vitro.
- Action sur les hématies isolées : hémolyse par les polymères ; variation de volume et résistance à l'hémolyse en solutions hypotoniques ; tentatives de protection contre la congélation ; action sur l'hémagglutination.
- Action sur les organes isolés : étude de la motricité du muscle lisse intestinal in vitro ; étude de la conduction dans le nerf de batracien in vitro.
- Action sur la sécrétion biliaire in vivo ; excrétion de la bilirubine biliaire et passage de l'eau dans l'hépatocyte.
- Phénomènes de toxicité potentielle in vivo : action sur l'oxalose expérimentale du rat.
- Discussion générale : rôle du blocage de l'eau ; rôle d'autres facteurs, (groupements lipophiles, tension superficielle, poids moléculaire) ; perspectives de recherche.

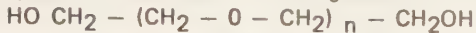
CHAPITRE II

ETUDE DES POLYMERES UTILISES

I.— PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

A) Polyoxyéthylène-glycols:

Les polyoxyéthylène-glycols (1), (ou poly-glycols, poly-éthylène-glycols, polyoxyéthylènes, polyox, carbowax, etc...) sont des polymères de condensation d'oxyde d'éthylène et d'eau. Leur formule générale est la suivante :



dans laquelle n varie suivant les corps de 3 à 225 environ (LE HIR, 1966). Lorsque $n = 0$, on a le monoéthylène-glycol ou éthylène-glycol ; si $n = 1$ on a le dioxyéthylène-glycol ou diéthylène-glycol ; si $n = 3$, on a le trioxyéthylène-glycol ou triéthylèneglycol ; c'est seulement au-dessus de ce stade qu'on peut parler de polyoxyéthylène-glycol. Nous désignerons ces corps par l'abréviation PEG. Ils sont généralement caractérisés par un chiffre représentant leur poids moléculaire moyen (PM), variant entre 200 et 20.000 (les plus courants sont compris entre 300 et 6.000). Une exception à signaler : le PEG 1500 n'est pas un produit de poids moléculaire 1500, mais un mélange à poids égal de PEG 300 et de PEG 1540.

Les chaînes des PEG sont linéaires ; toutefois deux formes moléculaires semblent pouvoir exister : la forme dite "zigzag" et la forme "méandre" (Staudinger et Lohmann, 1933; cité par LE HIR, 1966). La consistance des PEG varie avec leur degré de polymérisation : liquides lorsque le PM est compris entre 200 et 500, solides pour des PM supérieurs à 1000. La température de solidification est de 53 à 56° C pour le PEG 4000, de 60 à 63° C pour le PEG 6000. Le PEG que nous avons utilisé est voisin de ces deux derniers produits, et nous retiendrons donc surtout des données les concernant. Quelques chiffres sont rassemblés dans le tableau I.

La solubilité dans l'eau à 20° C est d'environ 62 % pour le PEG 4000, d'environ 50 % pour le PEG 6000. Le pH d'une solution aqueuse à 5% est de 4,5 à 7 à 25° C. Les PEG sont facilement solubles dans de nombreux solvants organiques : alcools, esters, éthers de glycols, cétones (acétone, cyclohexanone), hydrocarbures chlorés (tétrachlorure de carbone), hydrocarbures benzéniques (benzène, toluène, xylène). En règle générale, la solubilité des polyglycols domine légèrement à mesure que leur poids moléculaire augmente.

Stabilité et réactivité

Les PEG sont stables et très neutres chimiquement du fait de l'inertie de leurs nombreux ponts éther-oxydes. Ils ne sont absolument pas saponifiables, ne rancissent pas au stockage, ne moisissent pas et ne sont pas attaqués par les bactéries. Ils ne sont pas sensibles aux électrolytes, sont compatibles avec les eaux dures, les solutions salines de tous genres et même les acides, sauf cas extrêmes, tel que celui de l'acide sulfurique concentré. Sensibles aux lessives concentrées de soude et de potasse, ils sont en revanche compatibles avec les composés d'ammonium quaternaire dont ils n'affectent pas l'activité bactéricide.

(1) — Nom retenu par le Codex français.

TABLEAU I

Caractéristiques numériques de quelques poly-oxy-éthylène glycols (d'après document HOECHST).

Type	Poids moléculaire	Point de congélation (°C)	Viscosité à 25°C (cPo)		Indice d'hydroxyle mg KOH/g
			Produit pur	Sol. aqueuse 50 %	
200	190-210	≈ - 50	46-53		533-589
300	285-315	-16 à -12	66-74		356-392
400	380-420	2-6	85-95		271-299
600	570-630	17 - 22	130-150	13-15	178-197
1.000	950-1.050	35 - 40		18-22	107-118
1.500	1.400-1.600	44 - 48		29-34	70-80
2.000	1.900-2.200	48 - 52		40-48	51-59
4.000	3.900-4.800	53 - 58		90-120	23-29
6.000	5.600-7.000	55 - 60		170-220	16-20
10.000	8.500-11.500	55 - 60		400-600	9,6-13,0
15.000	13.000-17.000	≈ 60		1.000-1.500	6,6-8,6
20.000	> 17.000	≈ 60		> 2.000	< 6,5

Malgré leur passivité habituelle, les PEG sont capables de provoquer la précipitation de certaines matières en solution aqueuse, qui s'explique par la formation de composés polyoxonium. Parmi les substances susceptibles de réagir, mentionnons l'iode, l'iodure de potassium et de bismuth, l'iodure de potassium et de mercure, le sublimé, l'acide phosphomolybdique, l'acide phosphotungstique, le phénol, les crésols, la résorcine, le bétanaphthol, l'acide acétylsalicylique, le tannin.

Les PEG sont peu volatils et assez stables à la chaleur. Les liaisons éther résistent au chauffage jusqu'à 150° C. L'acide chlorhydrique dilué coupe la chaîne vers 170° C avec formation d'acétaldéhyde.

Contrôle - Dosage.

Les contrôles de pureté et d'identité des PEG sont décrits par LE HIR (1966). Signalons simplement que le taux de cendres est généralement inférieur à 0,1 % dans les polymères, parfois aussi faible que 0,03 %.

Le dosage des polyoxyéthylène-glycols n'est pas extrêmement commode. Parmi les nombreuses méthodes proposées, les plus souvent rencontrées reposent sur la transformation des PEG en dérivés oxoniums sous l'influence d'acides ou de sels, puis en complexes insolubles après l'addition d'anions convenables. En présence d'acide chlorhydrique et de chlorure de baryum, les PEG peuvent être précipités par l'acide silicotungstique ; le précipité est filtré, lavé, séché et calciné et le poids du résidu est multiplié par un coefficient qui varie d'un PEG à l'autre. On peut également précipiter par l'acide phosphotungstique, par l'acide phosphomolybdique ou par un tétraphénylborate. Dans ces différentes méthodes, les résultats ne sont interprétables que si l'on connaît le poids moléculaire moyen du PEG à doser, car la proportion des atomes d'oxygène capables de réagir varie avec le degré de polymérisation. Ce sont en effet les groupes $\text{CH}_2 - \text{O} - \text{CH}_2$ qui se combinent avec les ions métalliques. On trouvera des renseignements sur les méthodes de dosage dans les milieux biologiques dans : SHAFFER et CRITCHFIELD, 1947 a; HYDEN, 1955.

Il faut utiliser des filtrats de défécation complètement dépourvus de traces de protéines, préparés par exemple au sulfate de zinc - hydroxyde de baryum. Les urines peuvent être précipitées à l'acétate de fer. Le polyglycol est précipité par le silicotungstate de sodium; l'insoluble, calciné, est pesé ; on peut aussi précipiter au phosphomolybdate, digérer au Kjeldahl et doser le molybdène dans le liquide de digestion. Des méthodes moins précises utilisent la turbidimétrie de la solution après addition du réactif précipitant. Dans tous les cas, une gamme étalon est préparée avec le même échantillon de PEG, étant donné les différences trouvées d'un échantillon à l'autre.

Applications.

Dans l'industrie les applications des PEG sont multiples : bases de synthèses chimiques, plastifiants et agents de démoulage dans l'industrie du caoutchouc, des détergents, des produits ménagers, additifs lubrifiants et liants dans de nombreux domaines. Dans l'industrie pharmaceutique, ils sont largement utilisés comme excipients pour pommades, pour suppositoires, comme ingrédients améliorant la fabrication des comprimés.

En histologie, différents PEG ont été proposés pour le montage des spécimens histologiques (BLANK et MAC CARTHY, 1950) et pour préserver des organes entiers.

B) Plurionics :

Structure :

Les Plurionics (nom utilisé pour la première fois par la société WYANDOTTE, qui a déposé les premiers brevets pour ces substances) ou Emkalyx-Plurionics (nom utilisé par la société KUHLMANN) sont des polymères mixtes de

l'oxyde d'éthylène et de l'oxyde de propylène. Ils existent sous des formes physiques et chimiques différentes, désignées par des lettres codes. On trouve tous les degrés depuis la forme liquide (désignée par la lettre "L") jusqu'à la forme solide ayant l'aspect de paillettes (lettre "F" pour flakes). Entre les deux existe une forme pâteuse (désignée par la lettre "P"). Leur formule générale est la suivante : $\text{HO}(\text{CH}_2 - \text{CH}_2\text{O})_a - [\text{CH}(\text{CH}_3) - \text{CH}_2\text{O}]_b - (\text{CH}_2 - \text{CH}_2\text{O})_a - \text{H}$.

La gamme des poids moléculaires de ces produits est très étendue ; elle va depuis quelques centaines jusqu'à plus de 10.000.

Les pluronics sont numérotés suivant une certaine grille, qui caractérise leurs propriétés physico-chimiques. Le code est constitué de deux chiffres : le premier indique le poids moléculaire du polypropylène-glycol de base suivant une échelle arbitraire ; il est codé de la manière suivante : 3 pour 950 - 4 pour 1200 - 5 pour 1450 - 6 pour 1750 - 7 pour 2050 - 8 pour 2250. Le deuxième chiffre symbolise le pourcentage de poly-oxy-éthylène, c'est-à-dire de l'unité hydrophile dans la molécule. 1 signifie 10 %, 2 : 20 %, etc... jusqu'à 8 qui veut dire 80 % de polyoxy-éthylène.

Les combinaisons les plus courantes sont les suivantes : L-62, L-64, L-44, F-68. Dans les expériences rapportées ici, nous avons utilisé le pluronic F-68 (PF-68) (80 % d'unités hydrophiles ; poids moléculaire de la fraction hydrophobe : 1750). Cette composition mène à un produit dont le poids moléculaire est de l'ordre de 7500.

Préparation :

Les poly-oxy-alkylène glycols dont les groupements sont mélangés tout au long de la chaîne, tels qu'ils se forment lors de la condensation d'un mélange d'oxydes d'éthylène et de propylène, ne possèdent aucune propriété détergente. Dans les molécules de pluronic un nombre assez grand d'unités de polypropylène-glycol sont bloquées entre les deux extrémités de la chaîne, celles-ci étant constituées par des unités polyéthylène-glycol (block-polymère). Pour obtenir cette structure on part d'un poly-oxy-propylène que l'on condense avec de l'oxyde d'éthylène. Le poly-oxy-propylène glycol doit posséder un poids moléculaire de 900 au moins (LUNSTED, 1952).

Propriétés physiques :

Nous indiquerons seulement quelques propriétés du F-68, d'après PACIFICO, LUNSTED et VAUGHN (1950) et VAUGHN, SUTER, LUNSTED et KRAMER (1951).

Le PF-68 se présente en paillettes blanches, à odeur légère, à point de fusion 51 à 54°. Le pH d'une solution aqueuse à 0, 25 % est de 6,5 à 7,5 à 25° C. Il est peu hygroscopique. Après exposition dans l'air à une humidité relative de 80 % à la température du laboratoire pendant 7 jours, le gain en poids dû à la prise d'eau est de 3,6 % pour le PF-68. L'hygroscopicité est légèrement plus forte lorsque le poids moléculaire augmente ; néanmoins tous les pluronics sont beaucoup moins hygroscopiques que la plupart des détergents anioniques et cationiques classiques. Le PF-68 est soluble dans l'eau en toute proportions à 25° C. Le temps pour former une solution à 2 % dans des conditions standardisées à 25° C et avec une agitation continue (100 tours par minute) est de 4,5 minutes pour le PF-68. Notons que les solutions contenant plus de 75 % de PF-68 sont des produits pâteux ou solides. On ne peut guère pratiquement manipuler des solutions à plus de 40 %.

La solubilité de la plupart des détergents non ioniques dans l'eau décroît avec l'augmentation de température. Ceci permet habituellement de déterminer un point de précipitation, qui est défini comme la température au-dessus de laquelle la solution devient trouble car elle ne peut plus contenir une concentration déterminée de l'agent tensio-actif. Le PF-68 est unique à ce point de vue car il ne donne pas de point de turbidité dans l'eau distillée, ni dans l'eau calcaire, jusqu'à

100° C, et pour des concentrations allant de 0,5 à 40 %.

Le PF-68 est soluble dans les solvants organiques, l'acétone (10 %), l'éthylène-glycol (1 %). Il est soluble dans les huiles végétales et minérales à une concentration de 1,5 %.

Propriétés de surface :

Les pluronics sont des agents tensio-actifs, c'est-à-dire qu'ils modifient les tensions de surface et les tensions inter-faciales. La possibilité d'abaisser la tension superficielle et la tension inter-faciale de l'eau augmente en même temps que la portion hydrophile de la molécule diminue. Le PF-68 est donc un des moins actifs à ce point de vue. A 30° C la tension superficielle d'une solution aqueuse de PF-68 (dynes/cm) a les valeurs suivantes : 43,6 pour une solution à 1 %, 46,6 pour 0,1 %, 47,4 pour 0,01 %, 64 pour 0,001 %. (Rappelons que la tension superficielle de l'eau à 30° C. est de 71,2 dynes/cm). La tension inter-faciale entre le Nujol et la solution de PF-68 à 30°C, exprimée en dynes/cm, est de 13,2 pour 1 %, de 16 pour 0,1 %, de 16,6 pour 0,01 % et de 29,8 pour 0,001 %.

Le PF-68 facilite le maintien en suspension de particules solides, comme les particules de carbone ou de pigments, propriété très appréciée chez les détergents et qui correspond au nom lui-même de "pouvoir détergent". Son efficacité, supérieure à celle d'un bon savon dans ce domaine, subsiste dans les milieux alcalins ; elle est proche de celle de la carboxyméthylcellulose. Parmi les autres manifestations des propriétés tensio-actives, notons le pouvoir dispersant, l'effet mouillant, le pouvoir émulsifiant, les propriétés moussantes. Notons que les pluronics sont réputés pour être relativement peu moussants.

Parmi les combinaisons chimiques susceptibles de se former avec ces corps, on a signalé des combinaisons avec les dérivés phénoliques (MARCUS, WETSTEIN et RUDERMANN, 1956) et avec l'acide sorbique. La viscosité des solutions de PF-68 est nettement diminuée en ajoutant un sucre non hydrolysable. Les pluronics ne sont pas décomposés par les bactéries ; ils ne rancissent pas. Ils ne sont pas corrosifs par eux-mêmes, mais n'empêchent pas l'action corrosive normale de l'eau sur les métaux.

Applications

Les pluronics ont été utilisés pour le traitement des eaux (dispersion des sels de calcium et de magnésium), dans l'industrie textile et celle des colorants, pour améliorer le refroidissement dans les applications de taille et de meulage. Dans l'industrie des cosmétiques, on les a utilisés dans les schampoings, et pour solubiliser l'hexachlorophène (G11) (WYANDOTTE, 1961). En médecine, le PF-68 a été proposé comme laxatif (HARDOUIN et AUBRION, 1959).

Contrôle :

Etant donné la toxicité probable des bas-polymères du PF-68, il est important de discerner la présence de tels bas-polymères dans les échantillons. L'emploi du spectre infra-rouge permet de donner une réponse à cette question.

En effet, on peut voir sur ce spectre la quantité des hydroxyles OH par rapport aux radicaux CH_2 . L'oscillateur OH des compositions polymériques possède une fréquence fondamentale située vers 3 microns (3.333 cm^{-1}). Lorsqu'on passe des monomères aux polymères, la bande d'absorption correspondante subit des modifications : décalage vers les hautes fréquences et atténuation. On passe ainsi de 3.330 cm^{-1} pour l'éthylène-glycol à 3.460 cm^{-1} pour le polymère de poids moléculaire 6000. Pour le propylène-glycol on passe aussi de 3.333 cm^{-1} à 3.420 cm^{-1} lorsque l'on passe du monomère au polymère 2025. On observe en même temps un évanouissement progressif de la bande OH. Les échantillons de PF-68 ne doivent donc pas présenter de bande au voisinage de la bande des OH des monomères, c'est-à-dire en dessous de 3400 cm^{-1} . De plus, la bande comprise entre 3400 et 3500 cm^{-1} doit être très discrète (VAN RAPENBUSCH,

inédit). Nos échantillons de PF-68 ont toujours été contrôlés de cette façon.

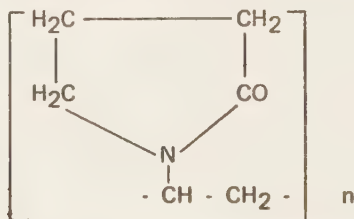
Dosage :

Etant donné la faible réactivité de la molécule des pluronics, les dosages sont difficiles et consistent généralement en un isolement du produit et à sa précipitation comme dans le cas des PEG. On peut par exemple doser le PF-68 en solution pure par turbidimétrie après précipitation au tétraiodomercurate de potassium. Des densités optiques convenables à 420 nm sont obtenues par cette méthode avec une concentration finale de produit de 0,05 à 0,19 p.1000. Une courbe d'étalonnage avec le même échantillon est nécessaire. Il est important que la quantité de produit présente tombe dans la gamme des concentrations couvertes par la courbe, et que l'on ne se trouve pas en présence d'autres corps susceptibles de précipiter dans les mêmes conditions.

On trouvera diverses autres méthodes de dosage des surfactifs non ioniques et des esters polyglycoliques voisins dans le travail de JOLY (1961). On rencontre le plus souvent des difficultés lors de l'extraction du produit à partir du milieu complexe envisagé. On se trouvera bien alors d'utiliser la technique préconisée par LE MOAN, pour l'extraction des résidus de pesticides dans les fruits (in : JOLY, 1961).

C) Polyvinylpyrrolidones :

La PVP est un polymère soluble dans l'eau, généralement de haut poids moléculaire, dont les propriétés physiques et chimiques permettent l'emploi comme succédané du plasma. Sa formule est la suivante :



On la prépare à partir de l'acétylène par des procédés anciens, tels qu'ils ont été établis par REPPESEN (1938, cité par GREENFIELD). La dernière étape du processus, la polymérisation du monomère, qui est la N-vinyl pyrrolidone, se pratique en solution aqueuse avec du peroxyde d'hydrogène comme catalyseur, la concentration de ce dernier contrôlant le degré de polymérisation. La synthèse est bien décrite par GREENFIELD (1957). Les préparations commerciales utilisées comme succédané du plasma sont des mélanges de chaînes de polymère dont le PM moyen est de l'ordre de 35.000 à 40.000, sans monomère résiduel. Celui-ci est en effet relativement toxique, mais peut être identifié assez facilement en raison de son insaturation et il est facilement extractible par le chlorure de méthylène. Le polymère est une substance neutre indissociée. Il semble que les chaînes de 150 à 720 unités se terminent par des radicaux acides, qui sont responsables d'une faible mobilité électrophorétique. Les propriétés hydrophiles sont probablement dues au groupement N-CO.

La PVP n'a pas de groupement titrable ni par l'acide, ni par les alcalins. Elle ne montre pas de pouvoir tampon appréciable et ne doit donc pas contribuer à modifier l'équilibre acido-basique des individus à qui elle est injectée. La taille moléculaire et sa distribution est habituellement caractérisée par une valeur K qui est une fonction de la viscosité (voir plus loin). Des valeurs de K allant de 20 à 100 correspondent à des poids moléculaires moyens situés environ entre 10.000 et 700.000 (GREENFIELD, 1957). Les produits possédant des valeurs de K entre 28 et 32 conviennent à l'usage clinique. Les poids moléculaires correspondants vont

de 30.000 à 40.000, ces produits ne contenant pas plus de 10 % de fractions de poids moléculaire inférieur à 15.000. La distribution des poids moléculaires est confirmée par fractionnement du matériel, par exemple à l'ultracentrifugeuse analytique, où l'on obtient un diagramme montrant la distribution gaussienne des constituants (MAY, HINES, WEINTRAUB, SCUDDER et GRAFF, 1954). Le poids moléculaire calculé par cette méthode coïncide avec ceux qu'indiquent les mesures de viscosité et les techniques de diffusion de la lumière. La PVP ne semble pas se combiner avec les protéines du sérum ni affecter leur distribution lorsqu'on l'étudie par ultra-centrifugation.

A l'électrophorèse, la PVP montre une mobilité basse à pH 8, dans l'appareil de Tiselius. Elle ne modifie pas la mobilité des protéines sériques. Elle migre avec la fraction gamma-globulines du sérum dans tous les essais effectués.

La PVP est soluble dans l'eau et dans beaucoup de solvants organiques : des alcools (méthanol, éthanol, alcools supérieurs, éthylène-glycol, glycérol), des composés halogénés (chloroforme, chlorure de méthylène), des aldéhydes et des cétones (acétone, cyclohexanone), des composés azotés (pyridine). Tous ces solvants donnent au moins des solutions à 10 % à la température du laboratoire. Certains solvants, comme l'acétone, entraînent quelques difficultés lorsque l'on veut dissoudre de la PVP non parfaitement anhydre (ce qui est le cas en général) car en présence d'un tout petit peu d'eau, le polymère tend à se séparer en donnant une deuxième phase visqueuse. La PVP pure est insoluble dans les solvants hydrocarbonés. Toutefois, on peut diluer des solutions de PVP dans un bon solvant par un apport d'hydrocarboné sans obtenir une précipitation immédiate. La PVP forme des complexes avec beaucoup de substances très variées : les colorants, l'iode, les antibiotiques, l'insuline.

On peut obtenir des gels stables avec le polymère en le traitant par des persulfates. En dehors de ses applications dans l'industrie pharmaceutique, la PVP a trouvé des emplois en particulier dans l'industrie des cosmétiques. La PVP présente certaines propriétés solubilisantes intéressantes. La solubilisation de l'iode élémentaire par formation d'un complexe iode/PVP en est un exemple. Mais il a également été montré que beaucoup de matériaux insolubles dans l'eau, allant depuis les éléments minéraux jusqu'aux saccharides et aux protéines, sont rendus plus solubles en présence de PVP (SHELANSKI et Coll, 1954).

Caractérisation :

La PVP donne la réaction de GUERIN au furfural sulfurique, réagit avec le p-diméthylaminobenzaldéhyde, avec l'iode. Elle est légèrement réductrice (liqueur de Fehling, bichromate et permanganate sulfuriques), précipite avec le réactif d'Esbach, les acides trichloracétique, tungstique, phosphotungstique. Elle ne précipite pas par les réactifs de Patein et de Courtonne (Spécia, Note technique "Subtosan").

Dosage dans les milieux biologiques :

Le dosage de la PVP est facile car elle réagit en faible concentration avec l'iode en donnant un produit coloré possédant un maximum d'absorption à 500nm et qui suit la loi de BEER-LAMBERT. Des déféquats obtenus à l'hydroxyde de zinc ou à l'alcool conviennent pour l'analyse du sérum. Pour le dosage dans l'urine on peut utiliser la méthode de Thrower et Campbell (1951). La réaction avec l'iode se fait bien pour des concentrations allant de 0 à 35 microgrammes de PVP par ml. Une courbe d'étalonnage est préparée avec de la PVP pure. A cette faible concentration, il n'y a pas de produit qui interfère dans l'urine. Dans le sérum, il est nécessaire de déféquer les protéines, qui réagiraient avec une partie de l'iode. On peut utiliser pour cela la défécation à l'hydroxyde de zinc de SOMOGYI (1930). Après défécation le filtrat est dilué environ au 1/500e pour se trouver dans le domaine correct de concentration.

TABLEAU II

Propriétés toxicologiques de quelques PEG (d'après document Union Carbide).

Poids moléculaire moyen	DL-50 rat, voie orale (g/kg)	Dose tolérée sans effet en administration chronique (% dans le régime)	Irritation primaire de la peau du lapin	Lésions oculaires (lapin)
200	28,9 (ml)	4 % (2 ans)	0	Trace
300	31,7 (ml)	4 % (3 mois)	0	0
400	43,6 (ml)	2 % (2 ans)	0	Trace
600	38,1 (ml)	8 % (3 mois)	0	Trace
1.000	42	8 % (3 mois)	0	Trace
1.500	44,2	4 % (3 mois)	0	0
1.540	51,2	4 % (2 ans)	0	Trace
4.000	> 50	4 % (2 ans)	Trace	0
6.000	> 50	16 % (3 mois)	0	Trace

II.— PROPRIETES BIOLOGIQUES

A) Polyoxy-éthylène-glycols :

Toxicité :

Les PEG sont peu toxiques ; par voie orale, la DL-50 chez l'animal est de l'ordre de 30 à 40 g par kg (LE HIR, 1966). La toxicité chronique a été étudiée entre autres par SMYTH et Coll. (1955) : administrés à des rats à la concentration de 4 % dans la nourriture, les PEG se sont montrés inoffensifs. Il en a été de même chez le Chien avec un taux de 2 %.

Par voie parentérale, la toxicité est un peu plus élevée tout en restant faible : la DL-50 par voie intra-veineuse est d'environ 8 g/kg chez le Rat. Le tableau II résume quelques propriétés toxicologiques des PEG.

L' "irritation primaire" se réfère à la réponse cutanée une journée après l'application de 0,001 ml de PEG à la peau rasée. Le "dommage oculaire" signifie dommage de surface après application du produit liquide ou solide ou de solutions des produits solides.

Métabolisme :

Il semble que les poly-oxy-éthylène-glycols de bas poids moléculaire soient absorbés en partie au niveau de l'intestin, tandis que les polymères de poids moléculaire supérieur à 1000 ne le sont pas du tout (SMYTH et Coll., 1955). Les PEG 4000 et 6000 sont même utilisés par de nombreux auteurs comme marqueurs non absorbés pour suivre le passage de l'eau dans le tube digestif de l'homme (BORGSTROM et Coll., 1957, JACOBSON et Coll., 1963, COOPER et Coll., 1966, SCHEDL et Coll., 1966).

Du point de vue du métabolisme on s'est posé très vite la question de savoir si les PEG et leurs dérivés se dégradent dans l'organisme en éthylène-glycol et en acide oxalique. Deux équipes, celles de SHAFFER (1947 b) et celle de MAC KENNIS (1962), qui ont fait des essais sur l'animal et sur l'homme, ont catégoriques à ce sujet : les PEG ne sont pas dégradés en éthylène-glycol.

Nous décrivons avec quelque détail les expériences portant sur l'absorption et le métabolisme des PEG, car elles constituent une base importante pour les études biologiques.

SHAFFER et CRITCHFIELD (1947 b) ont étudié l'absorption et l'excrétion des PEG solides de poids moléculaires moyens compris entre 1000 et 6000. Chez le Rat, l'absorption du produit était suivie par dosage des PEG selon la méthode gravimétrique des mêmes auteurs (1947 a). Les carbowax 6000, 4000, 1540 et 1000 étaient employés sous forme de solution à 25 %. L'examen statistique des résultats au niveau de signification de 0,001 montre que les composés 6000 et 4000 ne sont pas absorbés de façon mesurable dans l'intestin du Rat pendant une période de 5 heures. La dose initiale est retrouvée dans le tractus gastro-intestinal avec une précision correspondant à celle du dosage. Le Carbowax 1540 montre une légère absorption, inférieure à 0,027 g/100 g de poids corporel, c'est-à-dire moins de 2 % de la dose totale en 5 heures. Le Carbowax 1000 est également légèrement absorbé (0,022 g/100 g de poids corporel, soit moins de 2 % de la dose totale en 5 heures).

Le métabolisme après injection a été étudié chez l'Homme avec les Carbowax 1000 et 6000 (6 sujets adultes). Le PEG en solution à 5 % dans du chlorure de sodium isotonique, stérilisé à l'autoclave, était injecté doucement dans la veine de l'avant-bras à la dose de 20 ml de solution, c'est-à-dire 1 g de PEG. Les courbes d'excrétion urinaire des composés 1000 et 6000 sont superposables, le PEG 6000 étant éliminé plus rapidement que le composé 1000. Deux heures après l'injection, environ 75 % de la dose sont éliminés, et environ 90 à 95 % après 12 heures. Le Carbowax 1000 est moins rapidement excrété, sans doute en raison de sa plus grande tendance à diffuser à travers les tissus, et peut-être aussi en raison d'un métabo-

lisme plus actif. Dans ces expériences cependant, il n'y a eu aucune preuve de stockage des PEG dans l'organisme, et les auteurs supposent que les quantités injectées peuvent seulement être détruites ou excrétées. La quantité considérée comme métabolisée est alors trouvée en déduisant la quantité totale trouvée dans l'urine de la quantité injectée. Il est difficile de dire si cette différence représente une destruction réelle, une élimination par d'autres voies, ou une erreur analytique, surtout lorsqu'elle est petite. En ce qui concerne l'excrétion biliaire, des résultats sommaires présentés par SHAFFER, CRITCHFIELD et NAIR (1950) montrent que chez le Chien la bile excrétée pendant 24 heures après une dose orale unique de 2 g/kg de PEG 400 ne contient pas de quantités significatives de PEG.

En 12 heures, 94 à 99 % de la quantité injectée sont retrouvés dans l'urine dans le cas du PEG 6000, 80 à 87 % pour le PEG 1000. Les pourcentages moyens retrouvés dans l'urine de 6 sujets humains en fonction du temps après injection de 1 g de Carbowax 6000 et 1000, sont portés dans le tableau III. Dans le cas du Carbowax 1000, on peut établir un rapport non négligeable (0,173) entre la quantité détruite (ou plus exactement disparue) et la quantité effectivement éliminée. Ce facteur permet ensuite de calculer l'absorption du composé après administration orale.

Des expériences d'ingestion chez l'Homme ont été réalisées avec les PEG 6000 et 1000. Chaque sujet absorbe 10 g de Carbowax dissous dans 150 ml d'eau et on suit l'excrétion urinaire. Après l'absorption de Carbowax 6000, les quantités trouvées dans l'urine sont trop petites pour être déterminées et il est conclu que cette substance est pratiquement non absorbée dans le tractus gastro-intestinal de l'homme.

TABLEAU III

Elimination urinaire cumulée des PEG 6000 et 1000
chez l'homme après injection intra-veineuse de 1g de PEG,
calculé d'après SHAFFER et CRITCHFIELD (1947 b).

Temps après l'injection (h)	Pourcentage de la dose retrouvé dans l'urine	
	PEG 6000	PEG 1000
0,25	23,19	20,24
0,5	42,23	31,46
0,75	55,33	40,86
1	62,81	47,27
1,5	72,52	55,63
7	92,86	82,84
10	94,98	84,62
12	96,25	85,22

Cette conclusion est en parfait accord avec les résultats trouvés chez le Rat. Le composé 1000 est nettement absorbé, puisqu'on retrouve dans l'urine environ 10 % de la dose administrée au cours des 24 premières heures. Si on considère qu'une fraction du polymère absorbé a été détruite (1,8 % environ de la dose initiale), la fraction réellement absorbée au niveau de l'intestin serait de l'ordre de 12 %.

Une courbe d'absorption peut être construite en se basant sur des considérations théoriques.

De tels calculs amènent à considérer que l'absorption du PEG 1000 a pratiquement cessé trois quarts d'heure après l'administration de la dose de 10 g par voie buccale. Les valeurs de l'absorption totale pendant ce temps varient entre 778 et 872 mg et sont distribuées normalement.

Quant à l'excrétion au niveau du rein, il faut noter que les courbes d'excrétion sont tout à fait régulières et comparables entre elles dans tous les cas, alors que les débits urinaires obtenus pendant ces expériences sont très variés. Le PEG apparaît donc comme filtré et non réabsorbé. Les fluctuations du débit de l'eau n'affectent pas la vitesse d'excrétion du PEG, sauf lorsqu'un débit urinaire très bas permet une plus grande diffusion passive du PEG dans la circulation.

L'absorption du composé 1000 doit commencer aussitôt après l'ingestion. Il est frappant de constater que cette absorption a lieu avec une certaine rapidité pendant trois quarts d'heure et cesse ensuite presque entièrement, alors que la plus grande partie de la dose reste dans l'intestin. Deux explications sont présentées par les auteurs : la plus simple est que, puisque le PEG est en fait un mélange, la quantité absorbée puisse représenter la prise en charge d'une fraction à bas poids moléculaire. Ce raisonnement est appuyé par le fait que les Carbowax 4000 et 6000 ne sont pas absorbés. Une seconde explication, plus plausible, est que le site d'absorption est très probablement une région limitée, située haut dans l'intestin grêle, et que le PEG ingéré traverse cette région avant qu'une absorption considérable puisse se produire.

SHAFFER, CRITCHFIELD et NAIR (1950) ont étudié également l'absorption et l'excrétion du PEG 400, qui est un liquide. L'excrétion urinaire après administration d'une dose de 20 ml de soluté physiologique contenant 1 g de PEG 400 par voie intra-veineuse chez l'Homme est de 75 à 78 % en 12 heures. L'excrétion urinaire après une dose orale de 10 g de PEG 400 est de 44 à 48 % en 24 heures. Chez le Rat, l'absorption intestinale après administration d'une solution à 25 % de PEG 400 est de 62 % environ en 5 heures. Chez le Lapin, une dose orale de 8,50 g de PEG 400, donnée par tubage gastrique est suivie d'une élimination de 30 à 40 % dans l'urine et de 7 à 23 % dans les fèces en trois jours. Il faut noter que les auteurs considèrent comme possible une erreur de 5 % sur les dosages dans l'urine et de 33 % sur les analyses fécales.

Après injection intra-veineuse de 10 ml d'une solution physiologique contenant 0,40 g de PEG 400 chez le Lapin, on retrouve dans l'urine, en 24 heures, 46 à 49 % de la dose. Après 0,75 g de PEG 400, on retrouve 63 à 69 % de la dose en 48 heures. Ces résultats indiquent qu'une quantité substantielle de PEG 400 est dérivée vers d'autres voies métaboliques. Pour cette raison, les auteurs ont recherché le destin d'une perfusion intra-veineuse d'une solution à 5 % de PEG 400 chez le Chien. La vitesse d'excrétion urinaire a été comparée avec la vitesse de perfusion. En guise de contrôle, des expériences semblables étaient effectuées avec du Carbowax 4000, qui est très peu métabolisé. Alors qu'une moyenne de 98 mg de Carbowax 4000 est excrétée pour l'injection de cent milligrammes, on retrouve seulement 75 à 88 mg de PEG 400 pour cent milligrammes perfusés. Il existe donc une destruction métabolique significative du PEG 400.

La possibilité d'une production d'éthylène-glycol comme métabolite terminal a été soigneusement recherchée par dosage des substances oxydables par le periodate

avec formation de formaldéhyde (éthylène-glycol apparent). Le plasma et l'urine normale donnent une légère réaction, due principalement au glucose qui réagit avec cette méthode. Dans ces conditions, après administration orale ou intra-veineuse de PEG 400 à des sujets humains et à des chiens, les quantités de substances réactives sont extrêmement petites et irrégulières et ne sont pas en relation avec l'absorption et l'excrétion du PEG 400. L'éthylène-glycol n'est donc pas un métabolite du PEG 400.

De l'ensemble des résultats, il ressort que plus le poids moléculaire est petit, plus grande est la susceptibilité à une destruction métabolique et plus grande l'absorption à partir du tractus gastro-intestinal. Ces deux derniers phénomènes semblent devoir être reliés à la plus grande diffusibilité des molécules de petits poids moléculaires. SHAFFER, CRITCHFIELD et CARPENTER (1948) ont montré, comme on pouvait s'y attendre, que dans la série des PEG, la traversée des membranes de cellophane diminue avec l'augmentation du poids moléculaire et que, à l'intérieur de l'organisme, la distribution des plus hauts membres de la série est extracellulaire alors que le PEG 400 diffuse dans les cellules d'une manière considérable. Ces études ont été conduites chez le Chien avec des PEG de poids moléculaires s'échelonnant entre 400 et 6000. L'étude de la clearance rénale des PEG montre que la vitesse d'élimination est en général identique à celle de la créatinine chez le Chien, plaçant ainsi les PEG dans la classe des substances excrétées par filtration glomérulaire sans participation tubulaire. Pour les PEG 400, 1000, 1540 et 4000, le rapport moyen de la clearance du PEG à la clearance simultanée de la créatine est de 0,99 avec une déviation standard de 0,06. Les résultats obtenus avec le PEG 6000 sont un peu différents ; la clearance de ce corps est nettement plus faible que celle de la créatinine, ce qui est généralement considéré comme indiquant une résorption tubulaire du produit. Cependant, ni la saturation de l'activité excrétoire du tubule avec du diodrast, ni la saturation de l'activité de résorption du tubule avec du glucose ne produisent d'altérations significatives dans le rapport des clearances du PEG 6000 et de la créatinine. Ce manque d'effet du glucose montre que la résorption tubulaire du PEG 6000, si elle existe, est de la variété passive, tout au moins n'est pas compétitive avec le mécanisme glucose. Le concept de résorption tubulaire du PEG 6000 basé sur la diffusion seule n'est cependant pas attirant car c'est le produit le moins diffusible de la série, comme on peut l'attendre de son poids moléculaire plus élevé.

La distribution des PEG dans les compartiments corporels peut être estimée en suivant l'excrétion urinaire cumulée après injection intra-veineuse unique d'une quantité connue de chaque membre de la série. La quantité totale trouvée dans l'urine à chaque intervalle de temps est déduite de la quantité injectée et on divise cette différence par la concentration plasmatique, ce qui donne un volume. Les résultats sont compatibles avec l'interprétation d'une diffusion des PEG dans un volume correspondant approximativement à celui des liquides extra-cellulaires de l'organisme, sauf pour le PEG 400, qui montre un volume de diffusion plus grand. Toutefois, les auteurs n'ayant pas tenu compte du fait que les PEG de bas poids moléculaires peuvent subir une certaine destruction, les valeurs élevées du volume de diffusion trouvé pour le PEG 400 sont peut-être entachées d'une erreur par excès.

Le PEG 400 et le PEG 1000 sont filtrés quantitativement à travers des membranes de cellophane (DUPONT n°300 PT) à partir de solutions dans le sérum physiologique et dans le plasma. Par contre, le pourcentage filtrable diminue dans le cas de PEG 1540 et tombe brusquement avec le PEG 4000 et le PEG 6000. Dans les deux derniers cas la filtration est plus faible à partir du sérum physiologique qu'à partir du plasma et c'est donc davantage la perméabilité de la membrane que l'association aux protéines qui en est le facteur responsable. Des expé-

riences de contrôle ont montré que ce type de membrane est relativement imperméable à l'inuline (SHAFFER et Coll., 1948).

Les auteurs n'offrent pas d'explication au comportement anormal du PEG 6000 en ce qui concerne sa résorption apparente à partir du filtrat glomérulaire. Il est curieux qu'ils n'aient pas suggéré l'hypothèse d'une filtration plus faible de cette molécule à travers la membrane glomérulaire. Il est vrai que l'on considère généralement que le glomérule est perméable aux molécules possédant un poids moléculaire allant jusqu'à 40.000 environ (pour HECHT et SCHOLTAN, la PVP 40.000 filtre facilement ; in CHENDEROVITCH et Coll., 1961).

KATIC et KOBINGER (1962) ont observé une influence du PEG 400 sur l'excrétion des électrolytes dans l'urine du Rat. L'injection intra-péritonéale de 2 à 3 ml/kg de PEG 400 provoque une diminution de l'excrétion du sodium et du chlore alors qu'on n'observe aucune modification de l'excrétion du potassium. La diminution de l'excrétion des électrolytes consécutive à l'administration du PEG se produit presque totalement au cours des deux premières heures d'expérience. Pendant ces deux premières heures, on assiste également à une diminution du volume urinaire et de l'excrétion du potassium, mais au cours des deux heures suivantes, ce volume et l'excrétion de potassium sont nettement plus importants, ce qui fait qu'en 4 heures le potassium et le volume urinaire restent sensiblement normaux. Par contre, l'administration per os d'une solution de PEG 400 à 2 % (50 ml/kg) ne montre pas d'écarts significatifs par rapport aux résultats obtenus après l'administration du même volume d'eau distillée.

B) Pluronic.

Les surfactifs non ioniques sont les moins toxiques des trois catégories de détergents (JOLY, 1961). Pour les données concernant le PF-68, nous nous sommes reporté principalement aux publications WYANDOTTE (1961), à CAHEN et AUBRON (1959), à CHARNICKI (1958), à HARDOUIN et AUBRION (1959).

Toxicité aiguë : a) Voie orale.

Par voie gastrique, l'administration aiguë en solution aqueuse à 50 % à divers animaux montre une toxicité extrêmement faible. On n'observe aucune mortalité même avec 15 g/kg d'animal. Le seul symptôme est la diarrhée. Lorsque l'on tente de déterminer la dose mortelle moyenne (DL-50), on se heurte à l'impossibilité d'administrer une dose suffisamment élevée en raison du volume qui cesserait de devenir physiologique, la concentration de 50 % étant la plus forte qui puisse être administrée en raison de la viscosité de la solution (CAHEN et AUBRON, 1959).

Le Rat supporte parfaitement 15 g/kg de PF-68 par voie gastrique. L'examen microscopique et l'étude histologique du foie, des reins, du pancréas de huit rats sacrifiés 24 à 96 heures après l'administration ne montrent aucune altération pathologique. Chez cet animal, la toxicité du PF-68 est inférieure à celle des PEG 200, 300 et 400, telles que ces doses apparaissent à partir des expériences de SMYTH, CARPENTER et SHAFFER (1954). Chez le Chien, l'administration de 15 g/kg par voie buccale ne provoque pas de modification de la glycémie, de l'urée, de l'hémoglobine sanguine, ni du nombre des leucocytes et des hématies. Le seul symptôme observé est la diarrhée. Un chien pesant 11,500 kg a reçu jusqu'à 172 g de PF-68 en solution à 40 % sans montrer de symptôme de toxicité. Le Lapin ne montre aucun symptôme après administration de 15 g/kg par voie buccale. Chez la Souris la DL-50 est de l'ordre de 15 g/kg. Il convient cependant de remarquer que le volume considérablement élevé administré dans ces conditions n'est pas physiologique et que lui-même est considéré comme responsable de la mort.

Ces résultats sont corroborés par ceux d'une autre équipe (WYANDOTTE - 1961) qui trouve que la DL-50 pour la toxicité aiguë par voie orale sur cinq espèces d'animaux est supérieure à 15 g/kg.

b) Voie parentérale :

Par voie intra-péritonéale, le PF-68 a été administré chez le Rat et la Souris en solution aqueuse à concentration 50 % à des doses de 5 et 10 g/kg. Des décès ont été observés chez un certain nombre d'animaux, mais l'autopsie montre alors que la cavité intra-péritonéale est remplie d'une solution visqueuse. Les organes vitaux sont d'apparence normale. Il semble que les décès soient dus à un effet de masse non imputable aux caractéristiques chimiques de la substance (CAHEN et CHARLOT, 1959). Il s'agit peut-être d'un effet de déshydratation de l'organisme. Par voie intra-veineuse, chez le Lapin aucun symptôme toxique n'est noté à la dose de 1g/kg de PF-68. Chez le Chien, la dose de 0,50 g/kg I.V. ne provoque ni modification respiratoire ou vasculaire, ni altération électrocardiographique.

Toxicité chronique :

Le Rat supporte pendant 6 mois des concentrations de 1, 2 et 3 % de PF-68 dans la provende. Aucune action n'apparaît dans ces conditions sur la croissance, le taux d'hémoglobine, la formule sanguine, l'histologie des organes (CAHEN et CHARLOT, 1959). Il est intéressant de rapprocher ces données des résultats obtenus avec d'autres détergents tels que les alkyl-sulfates qui provoquent une mortalité considérable avec des concentrations de 0,25 à 1 % chez le Rat. De même, le Chien supporte bien des doses journalières de 0,1 à 0,5 g/kg pendant 6 mois. Dans ces conditions le gain de poids est régulier, on n'observe pas d'anorexie, pas de mortalité. L'examen hématologique, la glycémie, l'urée sont normaux.

Propriétés irritantes et sensibilisantes :

Sur la cornée de Lapin (méthode de DRAIZE), l'application de solution de PF-68 à 5 et 10 % ne produit pas d'irritation détectable. Ce fait est remarquable si l'on considère que la plupart des détergents classiques (Tween par exemple) sont extrêmement irritants même à des concentrations de 0,1 à 0,5 %. L'examen histologique de la conjonctive ne montre aucune modification vasculaire ou épithéliale. Il en est de même sur la peau intacte et les muqueuses labiales et gingivale du Lapin et du Chien. Sur la peau abrasée, le PF-68 à 50 % ne retarde pas la cicatrisation. Il n'a pas été noté de sensibilisation cutanée.

Propriétés hémolytiques :

Des solutions de PF-68 dans le sérum physiologique, à des concentrations variant de 0,1 à 10 %, mises en contact avec des hématies humaines à 25° C, ne donnent pas d'hémolyse pendant une période de 18 heures (CAHEN et AUBRON, 1959).

Effets laxatifs :

Chez le Rat, le PF-68 est capable d'accroître le volume des fèces, à la dose de 200 à 400 mg par kg par voie buccale.

L'activité propulsive gastro-intestinale, mesurée par progression d'un indicateur coloré dans le chyme intestinal, est relativement peu modifiée par le PF-68 (légère augmentation). A moins d'utiliser une dose considérable (6g/kg) on n'obtient aucun effet laxatif le premier jour. Par contre, en répétant l'administration pendant 2 jours à une dose de 3,2 g/kg, on obtient un effet laxatif moyen le deuxième jour. Dans tous les cas, l'effet apparaît et croît entre 24 et 36 heures. Le PF-68 est donc doué de propriétés hydrophiliques laxatives lentes à se développer (CAHEN et AUBRON, 1959).

Métabolisme :

Nous n'avons pas trouvé dans la littérature d'étude détaillée concernant le métabolisme du PF-68. On sait que lorsque le produit est administré par voie buccale, il n'est pas absorbé par la muqueuse intestinale. BORGSTROM (1957) a ainsi pu préconiser son emploi pour l'étude du transit intestinal chez l'Homme.

Cette propriété est à rapprocher de ce que l'on observe avec les polyéthylène-glycols. Lors d'une administration par voie intra-veineuse, il est vraisemblable que le produit filtre au niveau du glomérule et n'est pas réabsorbé par le tube.

C) Polyvinylpyrrolidone :

Il n'est pas dans notre intention de faire ici une étude exhaustive des propriétés biologiques de la PVP qui ont fait l'objet de nombreuses revues détaillées, en particulier celles de SIMON (1958), de MURAT (1945 et 1949), de LEFAUX (1952 et 1964). Nous signalerons simplement quelques points particuliers qui ont surtout trait à la PVP 40.000, la plus étudiée pratiquement.

BESSE (1951 a) a étudié l'action des injections intra-veineuses répétées de solutions concentrées de PVP chez le Lapin. Cet auteur rappelle que divers essais effectués chez le Chien ont montré qu'après cinq jours, 45 à 58 % du colloïde introduit a été éliminé, mais que le reste a subi un sort indéterminé. Pour HECHT (1955), le Périson (PVP de marque allemande) se trouve encore dans le courant circulatoire après trois ou quatre semaines. Chez le Lapin, les quantités éliminées en 20 jours sont de l'ordre de 25 à 27 % après injection d'une dose unique de PVP. Chez l'animal soumis à des injections intra-veineuses répétées de PVP, l'élimination urinaire du produit décroît : 17 % puis 2 %.

L'accroissement des doses injectées de PVP diminue la diurèse ; lorsque la période d'élimination urinaire est achevée (les 8 à 9 premiers jours) la diurèse reprend à des volumes sensiblement accrus. Malgré ces modifications, il semble que l'élimination de l'urée et des chlorures urinaires ne soit pas troublée. Après une baisse rapide pendant les premiers jours, la concentration sanguine de PVP reste ensuite relativement constante et ne décroît que très lentement. Un mois après les injections, le sang du Lapin contient encore des quantités appréciables de PVP (BESSE, 1951 a).

Une certaine quantité de PVP disparaît, car si l'on additionne les quantités retrouvées dans l'urine et les quantités présentes dans le sang, on se trouve en présence d'un déficit, qui n'est pas expliqué. La recherche de PVP dans les tissus montre que la PVP, 35 jours après une injection se retrouve dans le tissu musculaire, le tissu pulmonaire, le cœur, les reins, le foie. Des thésaurismoses à la PVP, ont été signalées (voir plus loin).

La sédimentation des globules rouges est fortement modifiée par la PVP. Pour une quantité de PVP de 225 mg pour 100 ml de sang, la sédimentation des globules du Lapin est fortement ralentie : 10 mm à la 24^{ème} heure au lieu de 40 mm environ. GUILLOT et FIEHRER (1947), VALETTE et ANGLADE-MARANDON (1954) ont fait des constatations comparables chez l'Homme in vivo et in vitro.

LEFEBVRE DES NOËTTES et GOUNELLE (1962) rapportent que WALTZ et MEYER (1959) ont observé une aggrégation des hématies in vivo chez le Chat par la PVP à partir d'un poids moléculaire de 50.000. Ils ont eux-mêmes obtenu des agrégats érythrocytaires chez le Hamster et le Lapin avec une PVP de poids moléculaire moyen 700.000.

SCHOEN (1949) a montré qu'après des injections intra-veineuses de PVP, on pouvait mettre en évidence du point de vue histologique des modifications de la rate et des ganglions lymphatiques. Ces modifications se traduisent par la présence de cellules spumeuses ou vacuolaires dans ces organes. CROMMER (1956) trouve la même chose dans le foie de la Souris. Pour HECKNER et GELLMANN (1955), la PVP s'accumule exclusivement dans les cellules réticulaires de la rate, et seulement lorsque le poids moléculaire dépasse 30.000, puis disparaît en l'espace de 3 semaines à 8 mois, sans provoquer cependant de blocage fonctionnel du système réticulo-endothélial.

BESSE (1951 b) a étudié l'élimination urinaire de la PVP après blocage expérimental du système réticulo-endothélial. Pour cela, il injecte au Lapin, par voie intra-

veineuse, 1 cm³ d'encre de Chine diluée dans 2 cm³ de soluté de chlorure de sodium, tous les deux jours jusqu'à 12 injections. La solution de PVP est injectée le 14^{ème} jour. Bien que son expérimentation paraisse discutable, cet auteur trouve que le blocage du SRE par l'encre de Chine et par le rouge neutre augmente partiellement l'élimination urinaire de la PVP. La quantité retenue dans le foie, les poumons, le coeur est plus faible que chez les témoins. Par contre, la fixation dans le muscle est plus grande. Compte-tenu de la quantité fixée par les viscères et les tissus, un déficit important en PVP est encore trouvé dans ces expériences.

MAURER (1956) a étudié le pouvoir antigénique de la PVP chez l'Homme et chez le Lapin. Les PVP utilisées avaient des constantes K de 16 à 87, ce qui correspond à des poids moléculaires moyens de 10.000 à 1.000.000. Chez le Lapin, aucune formation d'anticorps n'a été notée. Chez l'Homme, seule la PVP de PM 1.000.000 provoquait la formation d'anticorps. Toutefois, cette réponse antigénique était très irrégulière.

HUEPER (1956) a signalé une action cancérogène de la PVP chez le Rat ; à l'opposé, CHEVALLIER et Coll. (1961) ont observé une diminution de l'action cancérogène du 3-4 benzopyrène chez le Rat en présence de ce corps.

L'adjonction de PVP permet de réduire l'intensité ou de retarder l'apparition des effets primaires irritants dus à beaucoup de substances. Ainsi, SHELANSKI et Coll. (1954) ont essayé plus de 100 produits utilisés couramment dans les préparations cosmétiques et ont trouvé que la majorité de ces substances étaient moins irritantes en présence de PVP. Par exemple, l'alkyl-sulfonate de sodium et le N-Lauroyl-sulfonate de sodium essayés en solution à 1 % en application répétée sur la peau donnent des réactions commençant dès la troisième application. En présence de 1 % de PVP, on n'observe pas d'irritation avant la septième application.

Un effet détoxifiant de la PVP a été décrit. Ainsi le complexe iode/PVP est beaucoup moins toxique que l'iode élémentaire. La DL-50 de l'iode passe de 150 mg/kg à 1500 mg/kg en présence de PVP. La toxicité du mercure, de la nicotine, du cyanure est également réduite.

La PVP fixe fortement la thyroxine (TATA, 1960) et a la propriété d'inhiber l'instabilité de la thyroxine de façon tout à fait comparable au sérum total et aux protéines qui se combinent à la thyroxine. Une compétition de la PVP avec ces protéines se manifeste pour la fixation de la thyroxine disponible. (Rappelons que l'instabilité de la thyroxine se manifeste par une dissociation passagère de l'iode de la molécule, suivie d'une recombinaison progressive).

III. — CONTROLES PHYSICO-CHIMIQUES PERSONNELS.

Les échantillons de polymères que nous avons utilisés sont d'origine commerciale. Un certain nombre de vérifications ont donc été nécessaires, en particulier du point de vue de la détermination, au moins approximative, de leur poids moléculaire moyen. Quant à la pureté analytique et toxicologique, une confiance plus ou moins grande doit être accordée aux trois molécules selon leur origine.

Le PF-68 et le PEG 6000 sont de qualité "pharmaceutique", destinés à l'usage thérapeutique humain. La PVP 11.000 (origine KOCH-LIGHT) n'est pas garantie de qualité pharmaceutique et nous sommes assez peu sûr de sa pureté. Nous nous en sommes contenté, car il est relativement difficile de se procurer de bons échantillons de PVP de faible poids moléculaire, la plupart des fabricants s'axant sur la production de PVP pour transfusion (P.M. moyen 35 à 40.000). D'autre part c'est toujours la PVP qui a eu le moins d'action dans nos expériences, et nous n'avons donc pas eu à discuter son éventuelle toxicité.

A) Détermination de la teneur en eau :

a) Technique : Une prise d'essai voisine de 500 mg est pesée dans une capsule de porcelaine et desséchée à l'étuve à 110° C à poids constant (2 à 12 heu-

res selon les produits). On refroidit en présence d'anhydride phosphorique dans un dessiccateur.

b) Résultats : PF-68 : réf. 3287 : teneur en eau moyenne : 0,46 p.100 (n : 2) ; réf. F 3216 : teneur en eau moyenne : 0,15 p.100 (n : 2); PEG 6000 : Teneur en eau : 0,38 p.100 (n : 6). PVP 11.000 : P 266 h, réf. 12342 : teneur en eau moyenne : 6,4 p.100 (n : 3). P.266 h, réf. 29727 : teneur en eau moyenne : 5,0 p.100 (n : 3).

On conclut que seule la PVP renferme suffisamment d'eau pour qu'une correction due à ce facteur intervienne éventuellement.

B) Détermination du poids moléculaire moyen :

Ce contrôle est particulièrement important pour juger de l'importance des effets osmotiques amenés par les facteurs de petit poids moléculaire. Suivant les méthodes de détermination, on peut s'attendre à des résultats différents, donnant des indications sur le degré de dispersion des échantillons. En effet, certaines techniques dépendent d'un nombre de particules actives (tonométrie, cryométrie) et mettent relativement en évidence les fractions de petits poids moléculaire ; d'autres (viscosimétrie) donnent des indications sur les fractions de haut poids moléculaire. Les plus exactes, enfin, sont indifférentes et caractérisent chaque molécule en tant qu'individu : dosage des groupements terminaux.

Nous nous sommes efforcé autant que possible d'obtenir pour chaque polymère des indications par deux ou plusieurs de ces méthodes. Nous avons recherché des valeurs indicatives et nos mesures ne sont qu'approximatives. L'obtention de chiffres précis par ces méthodes est fort difficile ; elle nécessite un entraînement assez long, une parfaite connaissance des pièges techniques, et des mesures répétées et nombreuses ; il s'agit d'un travail de physicien que nous n'avons pas eu la prétention d'aborder.

1.— Viscosimétrie :

La viscosimétrie est une méthode empirique pour déterminer le poids moléculaire des polymères. Elle se base sur des données expérimentales publiées par d'autres auteurs qui ont confronté des valeurs de viscosité avec des déterminations de poids moléculaire effectuées par d'autres méthodes. Ces données ont été trouvées dans la littérature dans le cas des PEG et des PVP.

a) Technique : On utilise un viscosimètre d'Ostwald, placé dans un bain-marie au 1/100ème ° C, réglé sur 25° C. Les mesures de temps d'écoulement sont faites au chronomètre (3 à 5 mesures pour chaque solution), et on commence à noter les chiffres lorsque l'équilibre thermique est suffisamment bon pour obtenir des différences ne dépassant pas 2 à 4 dixièmes de seconde entre les mesures. Les solutions sont faites dans l'eau distillée à 0,5 - 1- 1,5 et 2 p.100 pour le PEG 6000, à 1 - 2 - 3 et 4 p. 100 pour la PVP 11.000.

b) Résultats :

a) PEG 6000 : Les temps moyens suivants (s) ont été enregistrés : OH₂ : 194,0 ; PEG 0,5 % : 207,4 ; 1 % : 224,0 ; 1,5 % : 237,6 ; 2 % : 254,4 (viscosimètre n° 4142). La viscosité intrinsèque est calculée par la formule :

$$[\eta] = \frac{t - t_0}{t_0 \cdot c}$$

avec : t : temps de la solution) en s.
 t₀ : temps du solvant)
 c : concentration en g/ml.

On trouve, par ordre de concentrations croissantes : $[\eta]$: 13,81 ; 15,46 ; 14,98 ; 15,56. La viscosité intrinsèque extrapolée à concentration nulle est estimée, sur un graphique tracé à partir des données précédentes, à la valeur $[\eta]$: 14,5 cm³ g⁻¹. La masse moléculaire moyenne est calculée d'après la

formule établie par MONNERIE et NEEL (1963) :

$$[\eta] = 2 + 0,027 \bar{M}^{0,725}$$

dans laquelle $\bar{M}$ était déterminée par acétylation. On trouve : $\bar{M} = 4.900$.

β). PVP 11.000

Les temps moyens suivants ont été enregistrés (viscosimètre n° 8980) :

OH₂ : 196,9 ; PVP 1 % : 210,1 ; 2 % : 225,6 ; 3 % : 241,4 ; 4 % : 260,0.

Ceci donne pour $[\eta]$: 6,70 ; 7,29 ; 7,53 ; 8,01. L'extrapolation graphique à concentration nulle donne $[\eta] = 6,40 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ à 25°C.

Dans les mêmes conditions, FRANK et LEVY (1952) trouvent $[\eta] = 7,7$ pour un échantillon de PVP de poids moléculaire moyen 7.000 (d'après une technique de diffusion de la lumière dans le méthanol).

Pour nos résultats, il convient de tenir compte de la teneur en eau de l'échantillon, qui n'est pas négligeable (6,4 p.100) et amène la viscosité intrinsèque à 25°C à la valeur de $6,83 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$. Pour GREENFIELD (1957), on peut définir une fonction K reliant la masse moléculaire du polymère à la viscosité relative d'une solution aqueuse à 1 p.100, de la manière suivante :

$$\text{Si } K = 1.0000 \text{ k on a : } \log \eta_r = \frac{75 \text{ k } 2}{1 + 1,5 \text{ k}} + k$$

Par contre, MAURER (1956) indique une formule un peu différente :

$$\frac{\log \eta_r}{C} = \frac{75 \text{ k } 2 + k}{1 + 1,5 \text{ k}}, \text{ d'après FIKENTSCHER}$$

(1932), sans indiquer ce que vaut C. Nous avons supposé, par analogie, que C : 1 (g/100 ml) dans la formule.

Dans la formule de GREENFIELD, c'est la viscosité relative d'une solution aqueuse à 1 % à 25°C qui intervient. Cette viscosité relative vaut ici : 1,067 ; 1,072 ; 1,075 ; 1,079 pour les quatre concentrations étudiées. L'extrapolation graphique à concentration nulle nous conduit à adopter la valeur de 1,065 à 25°C. En résolvant les deux équations ci-dessus, on arrive à K : 23,3 dans la formule de GREENFIELD, et K : 23,5 dans celle de MAURER.

On voit que malgré la dissemblance des formules (vraisemblablement due à une erreur de transcription d'un auteur à l'autre), les résultats sont très proches pour K.

Cette valeur de viscosité confrontée avec les données de FRANK et LEVY, pour des PVP non spécialement fractionnées, donne pour la masse moléculaire moyenne, une valeur de l'ordre de 9000 (relation $\eta = 1,3 \cdot 10^{-2} \cdot \bar{M}^{0,68}$).

2.— Tonométrie :

Parmi les méthodes donnant une indication sur la masse moléculaire par dénombrement de particules, nous avons effectué quelques mesures par tonométrie ou plus exactement par distillation isotherme (GREMY et PAGES, 1962). Un osmomètre Mechrolab modèle 301 A à été employé. Cet appareil permet de faire des mesures de tensions de vapeur assez précises pour certains solvants. Nous avons employé le benzène à 37°C.⁽¹⁾

a) Principe : Une goutte de solution et une goutte de solvant sont suspendues sur deux thermistances miniatures, dans une enceinte saturée de vapeur du solvant. Etant donné la différence de pression de vapeur entre les deux gouttes, un transfert différentiel de masse apparaît entre les deux gouttes et la phase vapeur du solvant donne une plus grande condensation sur la goutte de solution que sur la goutte du

(1) Nous remercions vivement Monsieur le Professeur BUVET, ainsi que Monsieur MONNERIE et Madame GORIN, qui nous ont permis d'effectuer ces mesures à l'école de Physique et Chimie.

solvant. Ce transfert produit une différence de température entre les deux gouttes (à cause de la chaleur de vaporisation), proportionnelle à la baisse de la pression de vapeur, et par conséquent proportionnelle à la concentration du corps dissous.

La variation de température étant une propriété colligative qui dépend seulement du nombre des particules présentes et non de leur nature, le calibrage de l'appareil peut se faire pour un solvant donné avec n'importe quel corps dissous pourvu qu'il soit bien défini chimiquement.

Le domaine de concentration permettant les meilleures mesures va de 0,005 à 0,1 M. Si la solution est plus concentrée, la condensation peut provoquer une variation de concentration. Si la concentration est plus faible, la reproductibilité est diminuée. A titre d'exemple indiquons qu'une solution 0,01 M dans le benzène donne un Δt de 0,016° C. environ, l'appareil permettant d'évaluer la différence de température avec une précision de $\pm 0,0001^\circ$ C. Parmi les solvants utilisables, le benzène, le toluène et le tétrachlorure de carbone marchent, donnent de bons résultats à 37° C. La méthode est limitée à l'étude de corps dissous ayant une faible pression de vapeur, car la goutte de solution doit maintenir une concentration constante pendant la mesure. Par exemple, si on travaille avec du benzène, à une température où la pression de vapeur est de 100 mm, la pression de vapeur du corps dissous doit être inférieure à 1 mm pour une précision de 1 %, inférieure à 5 mm pour une précision de 5 %, etc... La limite de la pression de vapeur du corps dissous est donc une fonction de la pression de vapeur du solvant et de la température de travail.

b) Description sommaire de l'appareillage :

La chambre de mesure est constituée d'une enceinte bien isolée thermiquement grâce à une épaisse paroi de mousse de polyuréthane, thermostatée au millièbre de degré par un thermostat à mercure interchangeable (Hewlett-Packard) non ajustable, préréglé en usine pour la température requise (37° C dans notre cas). Un dispositif convenable permet de déposer solvant et solution sur les deux thermistances de mesure. Celles-ci sont insérées dans un pont de Wheatstone alimenté en continu par une tension de l'ordre de 0,5 volt à partir d'une pile au mercure. La branche de mesure comprend quatre décades de résistances permettant de lire 0,01 Ω . Avec des thermistances de performances normales 0,01 Ω correspond à environ $5 \cdot 10^{-5}^\circ$ C. de variation de température. Il est à noter que la température de la chambre est maintenue à 0,001° C près, mais que la différence de température entre les deux thermistances dues aux variations de régulation de l'enceinte est plus faible que cela, car les deux sondes sont géométriquement proches l'une de l'autre et subissent presque ensemble les variations de l'enceinte.

c) Conduite d'une mesure : Les essais sont effectués après 24 heures de saturation de l'enceinte en vapeur de solvant et d'équilibrage thermique. On place une goutte de solvant sur chaque thermistance. Les décades de mesure étant au zéro, on règle le pont à l'équilibre, on répète plusieurs fois avec plusieurs gouttes de solvant pour avoir une mesure stable et une bonne référence de zéro, on remplace le solvant par la première solution à mesurer sur la thermistance de mesure (rincer par III ou IV gouttes), on déclenche un chronomètre et ramène le pont au zéro en agissant sur la decade. La lecture est notée après exactement 2 minutes (suivant les solvants, le temps optimum varie entre 2 et 5 minutes ; on observe toujours une légère dérive et il faut faire la lecture dès que cette dérive est suffisamment lente pour le permettre). Plusieurs mesures sont faites sur plusieurs gouttes pour avoir la moyenne.

d) Résultats : Nous avons appliqué la méthode au PEG et au PF-68. La PVP n'était pas suffisamment soluble dans les solvants organiques non polaires pour faire une bonne mesure dans nos conditions. Les résultats sont regroupés dans le tableau IV.

a). Etalonnage : La substance de référence employée est le terephthalate de diméthyle (PM = 194), $\text{H}_3\text{COOC} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{COOCH}_3$. Le solvant est du benzène redistillé conservé sur sodium (les molécules d'eau éventuellement présentes sont comptées comme particules...). Les quatre solutions employées sont calculées en termes de concentration molaires : elles vont de 0,0102 M à 0,0409 M (on part d'une solution mère convenablement diluée). Elles donnent respectivement des valeurs de déséquilibre du pont (ΔR) de 4,55 à 17,76 Ω (moyennes de 3 mesures). On calcule avec ces valeurs le quotient $\frac{\Delta R}{C/M}$ qui correspond au déséquilibre

qui serait théoriquement observé pour une solution molaire, estimé pour chacune des dilutions étudiées. On trouve des chiffres assez voisins pour chaque dilution, légèrement décroissants quand la concentration augmente. L'extrapolation graphique à concentration nulle donne $\frac{\Delta R}{C/M} (C \rightarrow 0) = K$.

Ce coefficient K correspond à $\Delta R (\Omega)$ pour une solution M estimé par extrapolation à $c \rightarrow 0$. Il sert à calculer la molarité des solutions inconnues.

TABLEAU IV

Résumé des mesures tonométriques
(solvant : benzène, température 37° C).

Terephthalate de diméthyle	Concentration (M)	0,0102	0,0204	0,0273	0,0409
	$\Delta R (\Omega)$	4,55	8,85	11,45	17,76
	$\frac{\Delta R (\Omega \cdot M^{-1})}{C/M}$	446	433	419	434
PF-68 (F 3216)	Concentration (g/l)	16,55	24,82	33,09	49,64
	$\Delta R (\Omega)$	1,46	2,22	3,60	5,73
	$\frac{\Delta R}{C} (\Omega \cdot l \cdot g^{-1})$	0,088	0,089	0,108	0,135
PEG 6000	Concentration (g/l)	4,97	9,94	13,25	19,88
	$\Delta R (\Omega)$	0,55	1,23	1,64	2,57
	$\frac{\Delta R}{C} (\Omega \cdot l \cdot g^{-1})$	0,111	0,124	0,124	0,129

β). Etude des polymères : PF-68. Les solutions étudiées sont faites en concentrations pondérales ; elles vont de 16,55 à 49,64 g/l. Elles donnent des ΔR moyens de 1,46 à 5,73 Ω (moyennes de 3 mesures, voir tableau IV). On calcule $\frac{\Delta R}{C}$ avec C en g/l. On observe que cette valeur croît avec la concentration.

L'extrapolation graphique pour $C \rightarrow 0$ mène à $\frac{\Delta R}{C} = 0,062$ (C en g/l et R en Ω)

Pour une concentration M, ΔR vaudrait $0,062 \times M = 447$ comme déterminé précédemment. Donc $M = \frac{447}{0,062} = 7.210$

PEG 6000. Les solutions mesurées ont des concentrations pondérales de 4,97 à 19,88 g/l. Les ΔR correspondants vont de 0,55 à 2,57 Ω (moyennes de 3 mesures). Les ΔR dans ces conditions croissent avec la concentration. L'extrapolation à $c \rightarrow 0$ donne $\frac{\Delta R}{C} = 0,114$ (Ω et g/l), ce qui mène à $M = 3.920$.

e) Causes d'erreurs : Deux causes d'erreurs principales sont à envisager dans nos mesures : le rôle de l'eau et les associations moléculaires. Elles sont de sens opposés. Les molécules d'eau, si elles existent à l'état libre, sont comptées comme particules, c'est-à-dire que 18 g d'eau interviennent dans la mesure comme 6000 g de PEG si l'on considère une particule de PEG de P.M. : 6.000. Elles interviennent donc environ 300 fois plus que le PEG. Une teneur en eau de 1/300ème, soit 0,3 p. 100, peut abaisser le poids moléculaire estimé de moitié, soit à 3000, si les molécules d'eau sont libres. Or le PEG étudié contient 0,38 p. 100 d'eau, et la viscosimétrie indique une masse moléculaire de 4.900. Si l'eau intervenait complètement, on pourrait s'attendre à trouver à la tonométrie une masse de l'ordre de 2.500. Il est donc vraisemblable que les molécules d'eau sont associées aux chaînes fortement hydrophiles du PEG et ne sont pas comptées comme particules.

Une deuxième cause d'erreur, de sens inverse, a été signalée, due à l'association des molécules par des liaisons hydrogènes, en particulier dans le cas de substances portant des groupes OH, NH, NH₂ et COOH, dissoutes dans des solvants non polaires. C'est évidemment le cas ici et il est possible que ce phénomène (qui conduit à des erreurs par excès dans la détermination du poids moléculaire) contrebalance en partie les erreurs introduites par les molécules d'eau.

Tout ce qui vient d'être dit s'applique également au PF-68.

3.— Cryoscopie : Nous avons été amené par diverses considérations (voir chapitre IV) à déterminer l'abaissement cryoscopique de solutions aqueuses pures à 2 ; 5 ; 10 et 20 p. 100 des trois polymères (Tableau V). Ces déterminations peuvent être considérées comme des évaluations du poids moléculaire d'après le nombre de particules, en écartant au besoin les solutions à 20 p. 100 qui seront considérées par les physico-chimistes comme trop concentrées, et en extrapolant à concentration nulle les valeurs de $\frac{\Delta t}{c}$ c'est-à-dire l'abaissement cryométrique par unité de concentration.

La technique de détermination est classique : cryoscope de type Beckman, thermomètre à mercure au 1/100ème. Chaque détermination est faite à 5 exemplaires, sauf pour les solutions 20 p. 100 où on a pris dix mesures par lot.

L'abaissement relatif $\frac{\Delta t}{c}$, en millièmes de degré par pour cent de concentration est relié d'une façon apparemment linéaire à la concentration du polymère. Lorsque le point 20 p. 100 s'écarte nettement des autres, on a tracé la droite avec les trois premiers points seulement. Dans ces conditions, l'extrapolation graphique à concentration nulle mène aux valeurs suivantes de $\frac{\Delta t}{c}$: 4,5 pour PF-68 ; 9 pour PEG 6.000 ; 25 pour PVP 11.000.

En considérant qu'une solution molaire aqueuse d'une substance non dissociée donne un $t = 1,858^\circ \text{C}$, on calcule M ; il vient : $M = 4130$ pour PF-68 $M = 2060$ pour PEG 6000, et $M = 740$ pour PVP 11.000.

Ces chiffres sont nettement plus faibles que ceux trouvés en solvants organiques. Nous discuterons plus loin de leur signification possible.

4.— Chromatographie : Dans le cas du PEG, un contrôle de migration a été effectué par chromatographie sur couche mince d'alumine avec un solvant acétone-

TABLEAU V

Abaissements cryoscopiques de solutions aqueuses pures
de polymères.

Concentration (g/100ml)	PF-68 (F 3260)	PEG 6000	PVP 11.000 (P 266 h . 26 935)
	Abaissement cryoscopique. ($^{\circ}$ C) et écart-type.		
2	0,013 $\pm$ 0,004	0,021 $\pm$ 0,009	0,052 $\pm$ 0,006
5	0,066 $\pm$ 0,009	0,078 $\pm$ 0,006	0,137 $\pm$ 0,014
10	0,194 $\pm$ 0,009	0,214 $\pm$ 0,010	0,305 $\pm$ 0,006
20	0,738 $\pm$ 0,041	0,850 $\pm$ 0,020	0,757 $\pm$ 0,017
	Abaissement cryoscopique relatif : millièmes de degré par pour cent		
2	6,5	10,5	26,0
5	13,2	15,6	27,4
10	19,4	21,4	30,5
20	36,9	42,5	37,8

ammoniaque selon la technique de BREITBURD, PUISIEUX et LEHIR (1966) (1). L'échantillon étudié donnait une tache unique, migrant entre les échantillons de référence PEG 4.000 et PEG 6.000, plus près de 4.000 que du 6.000 (révélation au réactif de Dragendorff).

5.— Discussion. COUPER et ELEY (1948) ont étudié certaines propriétés physiques des solutions de P.E.G. A partir des mesures de tension superficielle, ils ont estimé la surface couverte par une molécule de polymère au niveau de la surface du liquide. Ils trouvent ainsi (en $\text{\AA}$ carré par molécule) : 440 pour le P.E.G. 1.000, 530 pour le P.E.G. 1.540, 1.030 pour le P.E.G. 4.000, 1.390 pour le P.E.G. 6.000. La mesure du poids moléculaire à partir du point de congélation dans l'eau et dans le nitrobenzène donne à ces auteurs des valeurs de poids moléculaires notablement plus faibles que les valeurs prévues, exactement comme dans nos mesures personnelles. Ainsi, le P.E.G. 4.000 leur donne dans l'eau un poids moléculaire calculé de 1.290 et dans le nitrobenzène de 2.460. Le P.E.G. 6.000 donne dans l'eau 2.040 et dans le nitrobenzène 3.120. Ils pensent que cette erreur de détermination provient du processus d'extrapolation. En effet, lorsqu'on porte en gra-

(1) Nous remercions vivement notre ami F. PUISIEUX, Maître de Conférences Agrégé à la Faculté de Pharmacie de Paris, qui a bien voulu se charger de cette détermination.

phique Δt en fonction de $\Delta t/C$ (delta par unité de concentration) on trouve que pour les faibles concentrations il y a un écart significatif à linéarité, particulièrement marqué pour les P.E.G 4.000 et 6.000. Les poids moléculaires obtenus par la méthode de dosage des groupements terminaux sont considérablement plus grands que les autres résultats. (C'est par cette méthode que sont contrôlés les P.E.G. et le PF-68 par les fabricants). La différence résulte peut-être de l'hypothèse chimique : il n'existe que deux groupes OH par molécule. D'après les valeurs de surface calculées à partir des mesures de tension superficielle, COUPER et ELEY pensent que les molécules de polymère sont placées approximativement à plat à la surface de l'eau, contrairement à d'autres auteurs qui estiment que pour les PEG de poids moléculaires élevés les molécules s'orientent perpendiculairement à la surface comme des acides gras. Les valeurs trouvées pour le PEG 6.000 sont relativement grandes pour la viscosité intrinsèque et la surface de la molécule, lorsqu'on les compare avec les masses moléculaires moyennes calculées par des méthodes basées sur les propriétés colligatives. Ceci laisse supposer la présence d'une petite fraction de molécules très grandes dans le PEG 6.000 ; aussi les molécules de poids moléculaires très variés ne s'assemblent pas bien lorsqu'elles reposent à plat sur la surface de l'eau, et laissent des espaces libres, ce qui conduit à une grande valeur de surface moyenne par molécule. Comme les groupements hydrophiles (groupements éther) sont arrangés de manière régulière le long de la chaîne, il ne doit pas y avoir d'effet d'orientation. Cette conclusion s'applique sans doute à tous les polymères solubles dans l'eau.

C) Dosage du sodium et du potassium :

Ces dosages sont effectués pour dépister des impuretés minérales faussant éventuellement les données cryoscopiques observées sur les produits. On ne recherche pas une précision analytique, mais une indication sur l'ordre de grandeur.

a) Technique : Photomètre de flamme Eppendorff, flamme air butane, filtres interférentiels. Comparaison d'une solution aqueuse concentrée de polymère avec une dilution d'un étalon mixte Na^+ (3,30 g/l), K^+ (0,15 g/l), Ca^{++} (0,10 g/l) respectivement au 1/200 pour Na^+ et 1/20 pour K^+ . On néglige les différences de débit dues à la viscosité et à la tension superficielles des solutions.

b) Résultats :

1/ PF-68 (réf.3216) Résultats en g pour 100g de polymère solide :

- a) Na^+ : 0,031 p. 100
- b) K^+ : 0,00067 p. 100

2/ PEG 6000

- a) Na^+ : 0,012 p. 100
- b) K^+ : 0,00095 p. 100

3/ PVP 11000 (P 266 h réf. 12.342)

- a) Na^+ : 0,0035 p. 100
- b) K^+ : 0,0017 p. 100

Les polymères contiennent donc très peu d'impuretés sodiques et potassiques.

CHAPITRE III

INTERACTION DES POLYMERES AVEC L'EAU,
LES IONS ET LES PROTEINES ENZYMATIQUES.

Nous avons recherché par des tests simples la possibilité d'interactions fortes des polymères avec l'eau d'une part, avec certains ions monovalents comme le sodium d'autre part. In vitro, certains des polymères forment des gels, et nous avons tenté de préciser cette action.

I.— FORMATION DE GELS IN VITRO.A) Technique :

Les gels sont observés dans certains cas lorsque l'on met en présence le polymère avec un sel de métal alcalin ou alcalino-terreux, en solution concentrée.

Une série de solutions aqueuses a été réalisée pour chacun des polymères. Les concentrations étaient de 10, 20, 25, 30, 35 et 40 g pour 100 ml de solution. Pour l'étude de chaque sel, une série de 6 x 6 tubes à essais a été préparée. Chaque rangée de tubes a reçu des quantités d'un sel cristallisé pesées de manière à obtenir des concentrations de 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 et 3 M en ajoutant 2 ml de la solution de macromolécule essayée (les erreurs de concentration dues au volume propre des corps dissous ont été négligées, ainsi que celles provoquées par l'eau de cristallisation éventuellement présente). Les 2 ml de solution de macromolécule ont été ajoutés de telle sorte qu'à chacune des six concentrations essayées corresponde une gamme complète des six concentrations salines étudiées. Après addition de trois petites billes de verre dans chaque tube, une agitation mécanique des mélanges est effectuée durant dix minutes.

Après un repos de vingt-quatre heures à 4° C, la formation des gels est appréciée en se plaçant successivement à trois températures différentes : 4, 20 et 37+10° C.

Les tubes qui se laissent retourner et agiter sans déformation de la surface, ni mouvement des billes de verre emprisonnées dans le gel ont été considérés comme gélifiés.

Bien que des concentrations moléculaires identiques aient été essayées pour tous les sels, la valeur de l'expérience s'est trouvée, en général, bornée du côté des fortes concentrations par la limite de solubilité du sel considéré ; l'augmentation de concentration entre 2,5 et 3 M par exemple, n'est parfois que théorique car la solution étant saturée à la température considérée, on observe simplement une augmentation du dépôt insoluble dans le fond du tube, sans modification des caractères physiques du surnageant.

Les sels suivants ont été utilisés : sodium : chlorure, bromure, sulfate, phosphate monosodique, tartrate, carbonate acide ; chlorures : sodium, potassium, lithium, calcium, magnésium, ammonium, acide chlorhydrique ; sulfates : disodique, dipotassique, de magnésium, d'ammonium.

B) Résultats :1.— PF-68.

Ce polymère a donné des gels dans de nombreux cas. Il a donc été étudié en détail et l'on s'est efforcé de déterminer l'influence de l'anion et celle du cation



FIGURE I: Représentation schématique des zones de concentration favorables à la formation de gels pour des mélanges de PF 68 et de sels minéraux. Abscisses: concentration molaire du sel; ordonnées: concentration du polymère (g/ 100ml). De gauche à droite, état des mélanges aux températures de 4, 20 et 37°C. En pointillé: zones de gélification complète.

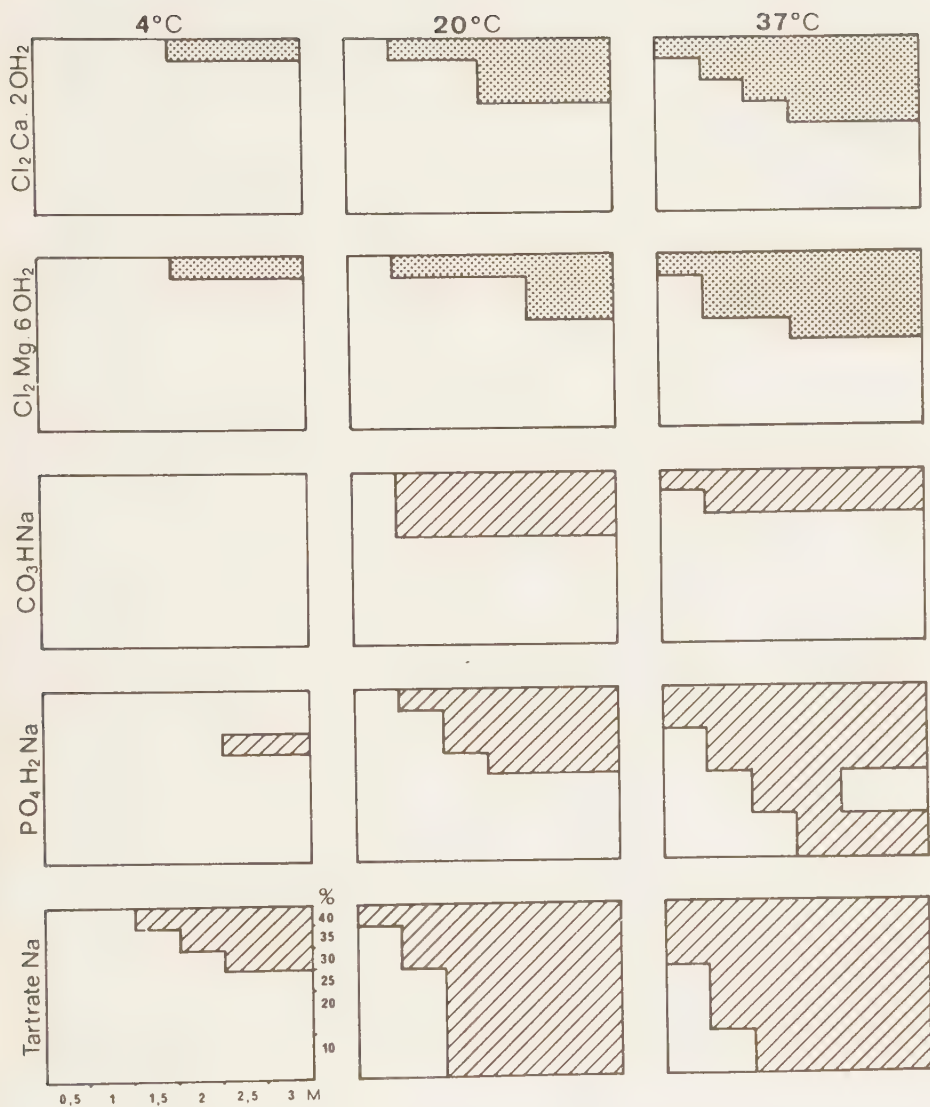


FIGURE 2: Représentation schématique des zones de concentration favorables à la formation de gels pour des mélanges de PF 68 et de sels minéraux. Echelles comme figure I; en pointillé: zones de gélification complète; hachures: zones de gélification partielle ou de systèmes biphasiques liquide - liquide.

dans le phénomène observé.

a) Influence de l'anion lié à un même métal :

Nous avons essayé les sels de sodium suivants : chlorure, bromure, sulfate, phosphate mono sodique, tartrate, carbonate monosodique. Les résultats de ces expériences sont représentés sur les figures 1 à 3. Les zones pointillées représentent le domaine de concentrations dans lequel une gélification complète a été observée. Pour chaque sel, les trois diagrammes correspondent, de gauche à droite, aux trois températures de lecture : 4,20 et 37° C.

Avec les anions oxygénés essayés, il n'a pas été possible d'obtenir de beaux gels limpides. On obtient le plus souvent une séparation en deux couches. Ces deux couches peuvent être simultanément liquides, ou l'une d'entre elles peut se gélifier. Dans ce cas, on a utilisé des hachures dans les figures. Il s'agit sans doute alors d'un phénomène du type relargage. Parfois l'ensemble se prend en masse, mais l'eau n'est pas retenue de façon satisfaisante dans le gel ; une pression exercée sur la masse solidifiée en fait sortir du liquide comme d'une éponge (on observe une sorte de synérèse). Dans ce cas également, des hachures indiquent que la gélification n'est pas absolument totale.

La gélification complète a été obtenue essentiellement avec le chlorure de sodium. Avec ce sel, des gels stables entre 4 et 37° C sont obtenus pour les concentrations suivantes :

- PF-68 30 p. 100 + Cl Na 2,5 à 3 M,
- PF-68 35 p. 100 + Cl Na 2 à 3 M,
- PF-68 40 p. 100 + Cl Na 1,5 à 3 M.

Avec le bromure de sodium, on obtient des gels stables entre 20 et 37° C dans les conditions suivantes :

- PF-68 40 p. 100 + Br Na . 20H₂ 1,5 à 3 M.

b) Etude de différents cations alcalins et alcalino-terreux liés à un même anion :

Nous avons essayé principalement une série de chlorures alcalins et alcalino-terreux, et accessoirement quelques sulfates.

α Chlorures : sodium, potassium, lithium, calcium, magnésium, ammonium; acide chlorhydrique.

– Avec l'acide chlorhydrique, aucun gel n'a pu être obtenu, ce qui confirme la nécessité de la présence d'un ion métallique. Les résultats obtenus avec le chlorure de sodium ont été rapportés plus haut.

– Avec le chlorure de potassium, on obtient des gels stables de 4 à 37° C dans les conditions suivantes : PF-68 : 40 p. 100 + ClK 2,5 à 3 M, et des gels stables de 20 à 37° C avec : PF-68 : 40 p. 100 + ClK 1,5 à 3 M.

– Avec le chlorure de lithium, les conditions favorables à la gélification sont les suivantes : Stabilité de 4 à 37° C : PF-68 : 40 p. 100 + Cl Li : 3 M ; Stabilité de 20 à 37° C : PF-68 40 p. 100 + Cl Li 1,5 à 3 M, PF-68 35 p. 100 + Cl Li 2,5 à 3 M.

– Avec le chlorure de calcium, on obtient des gels : Stables de 4 à 37° C : PF-68 : 40 p. 100 + Cl₂ Ca. 20H₂ 2 à 3 M ; stables de 20 à 37° C : PF-68 40 p. 100 + Cl₂ Ca. 20H₂ 1 à 3 M ; PF-68 35 p. 100 + Cl₂ Ca. 20H₂ 2 à 3 M ; PF-68 30 p. 100 + Cl₂ Ca. 20H₂ 2 à 3 M.

– Avec le chlorure de magnésium, les gels sont stables dans les conditions suivantes : de 4 à 37° C : PF-68 40 p. 100 + Cl₂ Mg. 6 OH₂ 2 à 3 M ; de 20 à 37° C : PF-68 40 p. 100 + Cl₂ Mg. 60H₂ 1 à 3 M, PF-68 35 p. 100 + Cl₂ Mg. 60H₂ 2,5 à 3 M, PF-68 30 p. 100 + Cl₂ Mg. 60H₂ 2,5 à 3 M.

– Enfin, avec le chlorure d'ammonium, on n'obtient pas dans ces conditions de gels stables de 4 à 37° C. Entre 20 et 37° C, par contre, on peut former des gels avec les proportions suivantes : PF-68 : 40 p. 100 + Cl NH₄ 2 à 3 M.

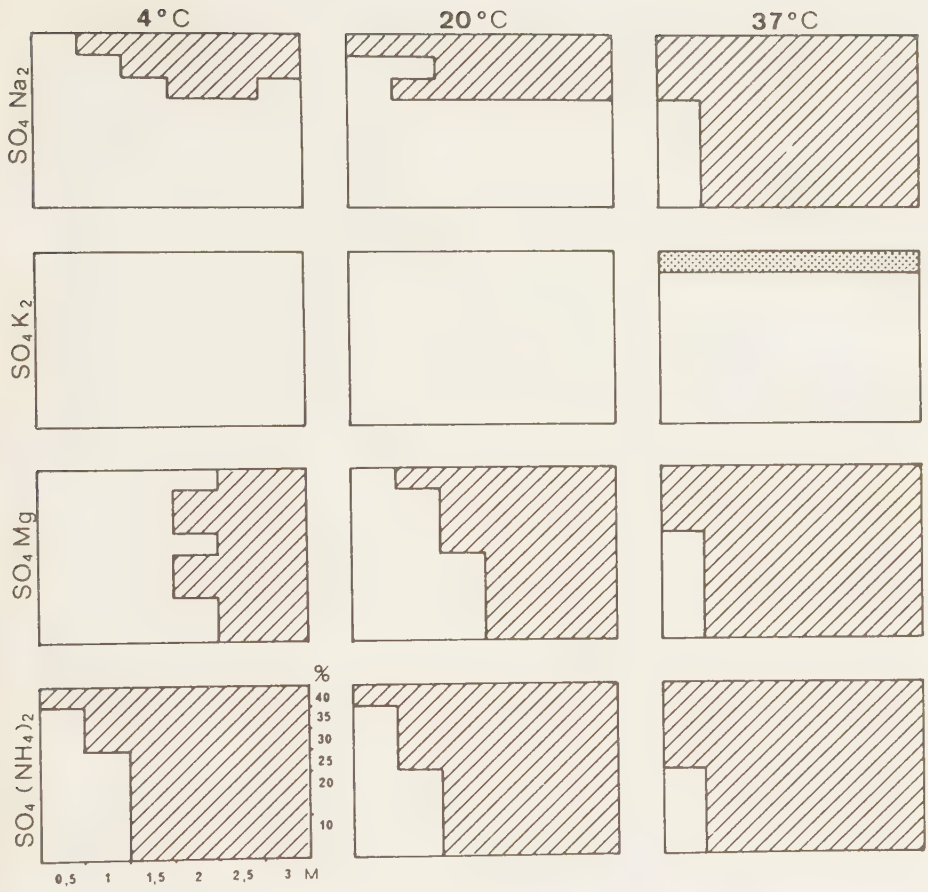


FIGURE 3: Représentation schématique des zones de concentration favorables à la formation de gels pour des mélanges de PF 68 et de sels minéraux. Echelles comme figures I et 2.

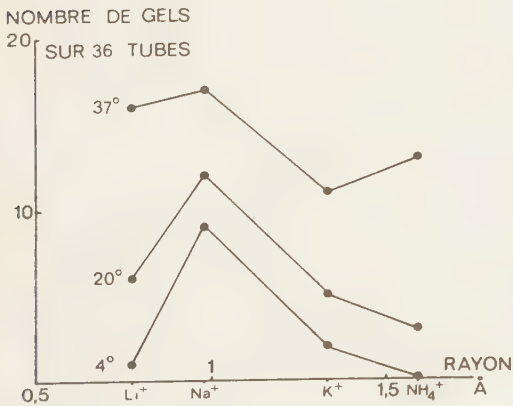


FIGURE 4: Aptitudes comparées des chlorures de Li⁺, Na⁺, K⁺ et NH₄⁺ à former des gels en présence de PF68. Les cations sont rangés en fonction de leur rayon à l'état cristallin.

On voit que les différents ions essayés ne montrent pas tous la même tendance à la formation de gels, bien que les concentrations moléculaires restent constantes. Pour approcher une explication du phénomène, nous avons porté sur la figure 4 le nombre de gels observés sur les 36 tubes (chiffre utilisé comme expression de l'aptitude de l'ion à former des gels) en fonction du rayon ionique exprimé en Å, pour les quatre ions monovalents essayés. Ces ions portant tous une charge positive, on peut penser que la valeur du rayon ionique donne une estimation du moment électrique et du pouvoir polarisant de l'ion (rayons ioniques d'après GOLDSCHMIDT, in LANGE, 1956). On voit sur le graphique que, tout au moins à basse température, il semble exister un rayon optimum autour de 1 Å, lorsque Cl^- est utilisé comme anion neutralisant. Il faudrait tenir compte du rayon de l'ion solvaté, mais celui-ci varie sans doute en présence du polymère et avec la température.

. β Sulfates alcalins et alcalino-terreux : sodium, potassium, magnésium, ammonium. Ici, comme avec les sels de sodium oxygénés, il n'est pas possible en général d'obtenir des gels complets, sauf avec le sulfate dipotassique 0,5 M dans PF-68 à 40 p. 100, mais ce gel est stable uniquement à 37° C (Dans le cas de $\text{SO}_4 \text{ K}_2$ il convient de tenir compte de la limite de solubilité, qui est de l'ordre de 0,5 M à 0° C et de 1 M à 37° C. Les concentrations supérieures à ces chiffres ne peuvent donc pas être atteintes).

Ces résultats sont donnés sous réserves de l'observation suivante : les mêmes expériences reproduites avec un PF-68 provenant d'une fabrication différente peuvent être légèrement différentes. On obtient toujours des gels stables à condition d'employer une concentration suffisante du polymère et du sel, mais les limites du début de gélification peuvent varier parfois de façon notable.

L'interprétation du phénomène sera donc prudente et ne tiendra compte que des phénomènes très grossiers. Cette réserve explique également certaines irrégularités des diagrammes des figures 2 et 3.

2.— PEG 6000 et PVP 11000 :

Ces deux polymères ne donnent aucune gélification avec le chlorure de sodium dans les conditions de concentration et de température précitées. Leur étude n'a donc pas été poursuivie en détail. Cependant, en présence de sulfate de sodium, et bien qu'aucun gel ne soit observé, on obtient une séparation du milieu en deux couches dont l'une semble contenir préférentiellement le polymère et l'autre le sel minéral, en concentration parfois si forte qu'il peut y cristalliser. L'analyse des deux couches a été effectuée dans un cas, celui du mélange polymère 30 p. 100 + $\text{SO}_4 \text{ Na}_2$ 100 ml du mélange ont été préparés et maintenus à 37° C jusqu'à dissolution totale. Après agitation et nouveau mélange, on laisse reposer et on sépare les deux phases dans une ampoule à décantation.

On pratique ensuite sur les deux phases une double analyse : résidu sec à 110° C jusqu'à poids constant (qui indique la somme polymère + $\text{SO}_4 \text{ Na}_2$) et dosage du sodium au photomètre de flamme, qui indique la partie minérale du résidu.

On obtient ainsi les valeurs suivantes :

PEG i (couche inférieure) : Na^+ 72,0 g/l ; extrait sec 318 g/l ;

PEG s (couche supérieure) : Na^+ 2,22 g/l ; extrait sec 512 g/l ;

PVP i (couche inférieure) : Na^+ 60,7 g/l ; extrait sec 191,2 g/l ;

PVP s (couche supérieure) : Na^+ 4,65 g/l ; extrait sec 542 g/l.

Les teneurs en sodium permettent de calculer les quantités de $\text{SO}_4 \text{ Na}_2$ mises en jeu. On trouve : PEG i : 222 g/l ; PEG s : 6,85 g/l ; PVP i : 187,3 g/l ; PVP s : 14,35 g/l.

Par différence on obtient les concentrations en polymères : PEG i : 96 g/l ; PEG s : 505 g/l ; PVP i : 3,9 g/l ; PVP s : 527 g/l.

Les volumes des deux phases pourraient être calculés en écrivant les équations du système, mais ils présentent peu d'intérêt.

On voit que le polymère s'est presque entièrement concentré dans la phase supérieure, surtout dans le cas de la PVP, alors que le sodium est presque entièrement présent dans la phase inférieure.

II.— ACTION SUR L'ACTIVITE DE L'ION SODIUM IN VITRO :

La constatation de certaines propriétés des macromolécules étudiées, en particulier la formation de gels en présence de fortes quantités de sels de sodium pour le PF-68, et l'hydrophilie des autres polymères, nous a incité à rechercher un effet sur les concentrations efficaces (activités) des ions monovalents ; le sodium a été choisi pour des raisons de commodité et parce qu'il est le principal ion extracellulaire. Si à une solution de chlorure de sodium (par exemple les liquides extracellulaires de l'organisme) on ajoute une macromolécule ayant une affinité pour l'eau ou l'ion sodium, on peut imaginer deux sortes d'effets possibles : soit la fixation d'un certain nombre d'ions sodium, entraînant ainsi une diminution de leur concentration apparente dans le milieu, soit la fixation d'un nombre appréciable de molécules d'eau, entraînant une augmentation de la concentration apparente des ions dans le milieu. Bien entendu, les deux phénomènes peuvent être associés, ce qui risque de produire des modifications plus faibles d'activité, les deux variations étant de sens contraires.

Nous avons choisi une méthode simple d'étude : l'emploi d'une électrode de verre perméable aux ions sodium.

A) Technique :

1.— L'électrode à ion sodium.

La mesure potentiométrique directe de l'activité d'un ion est basée sur le fait que des différences précises de niveau d'énergie existent entre deux états de la même matière ; pour un même état, ces différences sont proportionnelles aux populations relatives des atomes ou ions mis en jeu.

Dans les solutions d'électrolytes, ces différences de niveau énergétique sont faciles à mesurer sous la forme d'une différence de potentiel. L'équation de NERNST, classique en thermodynamique, exprime ainsi ce potentiel pour une concentration donnée de l'ion sodium, relativement à un état standard :

$$E_{\text{Obs}} = E_0 - \frac{RT}{nF} \log (a \text{ Na}^+)$$

avec :

E_{Obs} = potentiel observé,

E_0 = potentiel de l'état standard,

R = constante des gaz (en joules),

T = température absolue (degrés Kelvin),

n = nombre d'électrons mis en jeu dans la réaction réversible envisagée,

F = constante de Faraday

$\log (a \text{ Na}^+)$: Logarithme népérien de l'activité de l'ion à déterminer (ici le sodium).

La mesure de l'activité de l'ion sodium est obtenue avec une électrode de verre spécial en déterminant le potentiel développé entre l'échantillon et la solution de remplissage se trouvant dans l'électrode.

L'équation de Nernst prédit qu'à 25° C le potentiel à la membrane de verre change approximativement de 59 m V par décade de variation de la concentration en sodium, c'est-à-dire par unité de p Na ($p \text{ Na} = -\log [\text{Na}^+]$, par analogie avec le pH).

Dans les solutions habituellement mesurées, l'activité et la concentration diffèrent légèrement et on observe une variation de potentiel de 55 à 57 m V par décade de variation de la concentration en sodium.

L'électrode utilisée est du modèle Beckman 39278, associée à une électrode de référence au calomel et à un pH-mètre à échelle étalée Beckman 76. Elle est valable dans le domaine de concentrations allant de 1 à 10^{-4} M. En dehors du

sodium, l'électrode est également sensible à d'autres ions monovalents, en particulier l'ion argent et l'ion hydrogène. Pour ce qui est de l'argent, il ne se pose aucun problème lors du travail sur des liquides biologiques ou des solutions pures de sel de sodium. Par contre, le pH doit être contrôlé de telle sorte que la concentration en ions H^+ soit au moins 10.000 fois plus faible que la plus faible concentration de sodium à mesurer. En d'autres termes, le pH doit être supérieur d'au moins 4 unités à la plus forte p-Na à mesurer.

2.- Mode opératoire :

Pour étudier les variations d'activité sur un domaine de concentrations suffisamment étendu, nous avons utilisé le dispositif de la figure 5. Le liquide étudié est contenu dans un récipient en verre Pyrex, d'une contenance de 50 ml environ, thermostaté à 37° C grâce à une circulation d'eau. On place au départ dans le récipient 20 ml d'une solution normale de chlorure de sodium (58,5 g/l), dans laquelle sont immergées les électrodes, ainsi qu'un barreau magnétique pour l'agitation. Le pH-mètre est branché sur un enregistreur potentiométrique Philips PR 2200, réglé sur une gamme de mesure de 100 mV pleine échelle, avec zéro central. Etant donné les caractéristiques de transfert de l'ensemble pH-mètre enregistreur, cette sensibilité correspond à un déplacement de la plume sur le papier de 72 mm pour une unité de p Na.

Après équilibrage de la solution en température et stabilisation de l'indication donnée par l'électrode, on met en route le système de pompage-aspiration. Cet ensemble est constitué d'une pompe Technicon, actionnant une double tubulure branchée de sorte que l'un des tuyaux alimente le compartiment de mesure avec le solvant placé dans un récipient de stockage, tandis que l'autre tubulure, fonctionnant en aspiration, retire en permanence de l'enceinte de mesure une quantité de liquide égale à celle qui y est amenée. Les deux tubes de pompe ont été appariés de manière à présenter un débit suffisamment semblable pour ne pas entraîner de variation de volume sensible dans le compartiment de mesure pendant la durée de l'expérience (30 minutes environ). Leur débit est de 3,2 ml/min.

Dans ces conditions, la concentration du sodium dans la cuve de mesure peut être exprimée par une relation exponentielle.

Si l'on appelle P_0 la quantité de sodium au départ dans la cuve, p la quantité de sodium restante au temps t , v le volume de liquide dans la cuve et a le débit de la pompe, il vient :

$$dp = -a \frac{P_0}{v} \cdot dt$$

$$\text{On en tire } p = P_0 \cdot e^{-\frac{at}{v}}$$

$$\text{Log } p = \text{Log } P_0 - \frac{at}{v}$$

et en logarithmes décimaux :

$$\log p = \log P_0 - \frac{at}{2,3 v}$$

La même équation est valable pour les concentrations C :

$$\log C = \log C_0 - \frac{at}{2,3 v}$$

Etant donné les conditions expérimentales ($v = 20$ ml ; $a = 3,2$ ml. min⁻¹ ; $C_0 = M$), on en tire aux temps 10, 20 et 30 minutes, les concentrations suivantes : 0,202 ; 0,041 et 0,0081 M.

De façon analogue, les concentrations $M/10$ et $M/100$ sont atteintes lorsque $-\frac{at}{2,3 v}$ prend respectivement les valeurs - 1 et - 2, ce qui donne pour t : 14,4 et 28,8 min.

En fait, nous ne nous sommes pas préoccupé de connaître les valeurs précises des concentrations de sodium restant dans la solution à chaque temps, mais nous avons fait des mesures comparatives, en perfusant successivement dans 20 ml

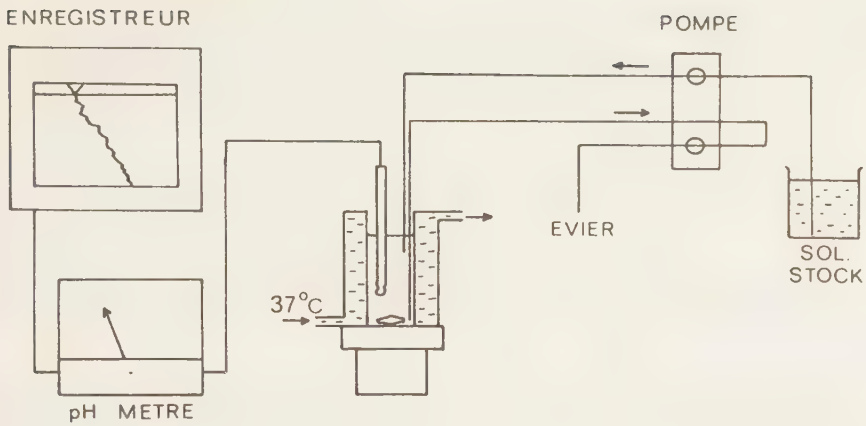


FIGURE 5: Schéma du dispositif de perfusion à volume constant utilisé pour les mesures de pNa.

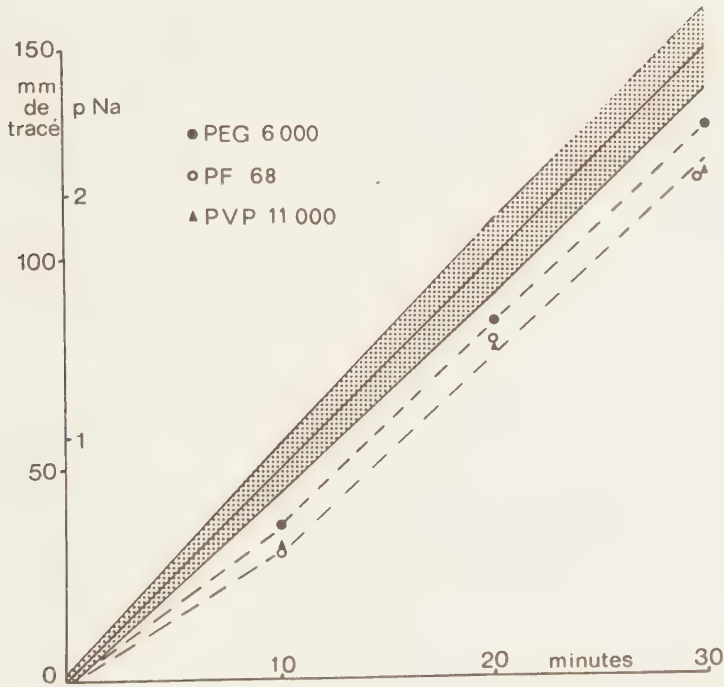


FIGURE 6: Exemples de points expérimentaux obtenus avec des solutions de polymères à 30%. La zone hachurée représente l'intervalle de confiance 0,05 (n=8) des résultats trouvés en perfusant de l'eau distillée dans la solution de base (ClNa M).

de Cl Na M les solutions stock suivantes : eau distillée, PF-68 à 3, 10 et 30 p. 100, PEG 6000 à 3, 10 et 30 p. 100 ; PVP 11000 à 3, 10 et 30 p. 100.

La variation de la concentration du polymère se fait donc en sens inverse de celle du sodium. Partie de zéro, elle a à l'instant t la valeur C , telle que :

$$C = c \cdot \left(1 - e^{-\frac{a \cdot t}{v}} \right)$$

avec c : concentration du polymère dans la solution perfusée,

a : débit de la pompe, et

v : volume de liquide dans la cuve.

Ainsi, aux temps 10, 20 et 30 minutes, C vaut respectivement pour les trois solutions perfusées : 2,39 ; 7,98 et 23,9 p. 100 ; 2,87 ; 9,59 et 28,7 p.100; 2,96 ; 9,86 et 29,6 p. 100.

B) Résultats :

Les résultats sont obtenus sous formes de graphiques montrant la variation du potentiel de l'électrode au cours de l'expérience. Cette variation de potentiel est mesurée en graduations arbitraires (mm de tracé à l'enregistreur), sachant que 1 m V à l'électrode vaut 1,25 mm de tracé.

La linéarité de la réponse est bonne lorsque la perfusion est faite avec de l'eau distillée, ce qui couvre un peu plus de deux unités de pNa (pNa de 0 à 2,1). Lorsque les polymères sont perfusés, on observe une augmentation de la pNa, bien visible avec les solutions concentrées, comme l'indique la fig.6. Cependant cette augmentation n'est pas toujours exactement proportionnelle à la concentration, et nous l'avons discutée avec soin, puis vérifiée par une autre technique.

C) Discussion :

1/ Nous avons vérifié que malgré la forte viscosité des solutions concentrées de polymères, le débit de la pompe employée reste constant. La quantité de polymères perfusée par unité de temps est donc constante.

2/ Le rôle du pH n'est peut-être pas négligeable. Pour qu'il n'ait aucun rôle, il faudrait qu'il soit au moins supérieur de 4 unités aux pNa mesurées. Ces dernières allant de 0 à 2, le pH devrait être égal ou supérieur à 6. Les solutions de PF-68 ont un pH voisin de 6,5, celles de PEG un pH de 5 et celles de PVP avoisinant 4,7. Seul le PF-68 remplit donc les conditions ; toutefois l'erreur ainsi introduite est faible.

3/ L'électrode employée a une réponse relativement lente et il faut souvent plusieurs minutes pour l'équilibrer au départ à 37° C ; elle répond plus lentement à une diminution de pNa qu'à une augmentation. Le temps de réponse pourrait jouer un rôle dans la pente de la droite tracée par l'électrode, bien que le travail s'effectue sur 30 minutes, donc relativement lentement. Si l'on augmente encore le temps de dilution, la dérive du pH-mètre risque de devenir gênante.

4/ Un autre phénomène risquant d'interférer est la présence de sodium dans les polymères, ce qui fait que plus la solution est concentrée, plus la quantité de sodium apportée est forte. L'erreur ainsi commise peut être évaluée d'après les dosages de sodium.

Les dosages rapportés au chapitre II permettent de calculer la quantité de sodium présente dans les solutions à 3,10 et 30 p. 100, soit respectivement :

- PF-68 : 0,93 ; 3,1 et 9,3 mg de Na pour 100 ml,
- PEG 6000 : 0,36 ; 1,2 et 3,6 mg de Na pour 100 ml,
- PVP 11000 ; 0,10 ; 0,35 et 1,0 mg de Na pour 100 ml.

Ces quantités peuvent devenir gênantes dans le cas des solutions concentrées à partir de 20 minutes, temps après lequel la concentration de sodium tombe au-dessous de 1 g/l. tandis que la concentration de polymère atteint 95 p. 100 de la valeur de la solution stock.

5/ Pour annuler expérimentalement ces diverses erreurs, nous avons organisé une expérience statique, dans laquelle on mesure simultanément pNa et pH. Dix-neuf solutions ont été préparées avec la même eau distillée :

- PF-68, PEG 6000 et PVP 11000, respectivement à 5, 10 et 20 p. 100 (p/v) dans chaque cas ;
- les mêmes solutions contenant en plus 9 g/l de ClNa ;
- ClNa 9 g/l.

On se place ainsi dans un domaine de concentrations proche des conditions employées *in vivo* et *in vitro* sur organes isolés.

On mesure à 37° C les pH et pNa obtenus, qui sont portés dans le tableau VI.

TABLEAU VI

Mesures statiques de la pNa et du pH à 37° C sur des solutions pures et enrichies en ClNa de polymères (électrode 39278, PF-68 n° 3287, PEG Ser., PVP P 266 h n° 29727). Successivement dans chaque case : pNa et pH.

	Polymères seuls (p. 100)			Polymères (p.100) + Cl Na 9 p. 1000		
	5	10	20	5	10	20
PF-68	2,98	2,77	2,45	0,49	0,44	0,35
	6,3	6,4	6,7	6,0	6,1	6,2
PEG 6000	2,45	2,34	2,34	0,44	0,36	0,26
	4,9	4,8	4,9	5,1	4,8	4,7
PVP 11000	2,26	2,16	2,19	0,41	0,37	0,29
	4,6	4,6	4,7	4,6	4,6	4,7

ClNa 9 p. 1000 : 0,813 et 5,4.

Si l'on transforme les pNa en quantités de Na mesurées, on s'aperçoit (tableau VII) que la présence des polymères multiplie par un facteur de 2 à 3 les quantités de sodium mesurées par rapport aux quantités réellement présentes, telles qu'elles sont estimées d'après les dosages. La séquestration de l'eau sur les molécules de polymères semble donc pouvoir se traduire par une augmentation de la concentration apparente de l'ion sodium.

Pourquoi ce phénomène apparaissait-il moins clairement sur les tracés en continu ? Nous pensons que deux facteurs en sont responsables : le temps de réponse de l'électrode est sans doute trop long pour suivre les variations rapides de concentration imposées par le système de perfusion. D'autre part, des arguments expérimentaux divers nous font penser que les polymères ne s'équilibrent pas immédiatement avec leur entourage. Il est vraisemblable dans ces conditions que la fixation ou l'exclusion du sodium demande un certain temps de contact, ce qui n'était pas le cas dans les expériences de perfusion.

Ce point est important, et il nous paraît possible que, selon les conditions d'expérience, on puisse obtenir une augmentation ou une diminution de la concentra-

TABLEAU VII

Correspondance entre les pNa mesurées et la quantité de sodium théoriquement présente. Mesures statiques à 37° C.

		p Na	Na (M) (d'après p Na)	Na (g/l) (d'après pNa)	Na (g/l)	Quantités réel- lement pré- sentes d'après les dosages de sodium(g/l)
POLYMERES SEULS	PF-68 ⁽¹⁾	2,98	0,00105	0,024	Quantités attendues d'après les mesures sur C I Na pur et sur les solutions pures des polymères	0,016
		2,77	0,00170	0,039		0,031
		2,45	0,00356	0,082		0,062
	PEG	2,45	0,00356	0,082		0,006
		2,34	0,00457	0,105		0,012
		2,34	0,00457	0,105		0,024
	PVP	2,26	0,00550	0,126		0,002
		2,16	0,00682	0,157		0,004
		2,19	0,00645	0,148		0,008
	CI Na seul		0,813	0,154	3,54	3,54
	POLYMERES + CI Na	PF-68	0,495	0,320	7,36	3,56
			0,445	0,359	8,26	3,58
			0,350	0,447	10,03	3,62
		PEG	0,445	0,359	8,26	3,62
			0,365	0,432	9,94	3,64
			0,260	0,550	12,65	3,64
		PVP	0,415	0,384	8,84	3,67
			0,375	0,422	9,70	3,70
			0,295	0,507	11,65	3,79
						3,54
						3,54
						3,55

(1) Successivement dans chaque case : solutions à 5, 10 et 20 p. 100.

tion apparente du sodium, en fonction des temps de contact, et selon qu'il y a fixation ou exclusion des ions au voisinage de la chaîne du polymère.

6/ Une interférence des polymères dans les propriétés de l'électrode elle-même doit être considérée comme possible tant que d'autres méthodes n'auront pas confirmé ces résultats.

III. — ACTION SUR DES SYSTEMES ENZYMATIQUES IN VITRO :

Pour expliquer certains phénomènes observés *in vivo*, et que nous décrirons plus loin, il était nécessaire d'évoquer une action éventuelle inhibitrice ou activatrice d'enzymes, que l'on pouvait envisager compte-tenu de la dénaturation protéique observée *in vitro*. Nous avons donc effectué quelques essais visant à mettre en évidence l'éventualité d'une telle action. Ces essais sont restés grossiers et empiriques, car l'effet recherché devait être massif pour pouvoir être invoqué. Nous avons mis en présence de leurs substrats un certain nombre de systèmes enzymatiques non purifiés, et évalué leur activité en présence des polymères. Les sources enzymatiques employées étaient les suivantes : plasma de Rat, foie de Rat, hématies humaines. Les systèmes enzymatiques essayés ont été les suivants : transaminase glutamique-pyruvique (plasma de Rat et foie de Rat), méthode UV au NADH en présence de lacticodes hydrogénase et méthode colorimétrique à la dinitrophénylhydrazine ; transaminase glutamique-oxaloacétique (plasma de Rat), méthode UV au NADH en présence de malicodéshydrogénase ; lacticodéshydrogénase (plasma de Rat), méthode UV au NADH ; malicodéshydrogénase (plasma de Rat) méthode UV au NADH ; phosphatase alcaline (plasma de Rat), méthode colorimétrique au p. nitrophényl phosphate ; amylase (α , amylase bactérienne), microméthode automatique à l'iode-amidon (CHARIOT, ROZE, SOUCHARD, 1966) ; glucose 6 phosphate déshydrogénase (hématies humaines) méthode UV au NADP.

En général, l'addition des polymères était réalisée de façon à obtenir des concentrations finales de 2 , 5 et 10 p. 100 dans le milieu d'incubation. Dans d'autres cas des concentrations de 0,3 ; 0,7 ; 1,5 ; 3 ; 7 et 15 p. 100 ont été employées.

Les résultats ne seront pas rapportés en détail car malgré le nombre des expériences réalisées (environ 600 dosages), aucune action spectaculaire n'a été observée. Lorsque de petits effets ont été constatés, il a toujours été difficile dans nos conditions d'éliminer l'influence de facteurs non spécifiques tels que le pH et d'obtenir une bonne reproductibilité. Pour arriver à des conclusions saines il faudrait reprendre le problème d'une façon strictement biochimique, avec des enzymes purifiés et des conditions de travail parfaitement standardisées.

Il nous a paru que l'intérêt du travail n'était pas suffisant pour justifier un tel effort, et nous n'avons pas approfondi ces question, nous réservant de le faire éventuellement plus tard, étant donné que les effets constatés n'ont jamais été spectaculaires. Notons cependant que l'absence d'action sur les enzymes étudiés contraste de façon intéressante avec la précipitation des protéines plasmatiques obtenues *in vitro* dans certaines conditions (voir chapitre IV).

Discussion : Des biochimistes nous ont fait remarquer que si les petits effets constatés étaient dûs à une variation de pH, ils étaient sans intérêt, et que d'autre part les concentrations employées étaient trop fortes. Cependant, des travaux de ce genre ont été effectués, par exemple avec le diméthylsulfoxyde (D.M.S.O.). Ainsi RAMMLER (1967) a étudié l'effet du D.M.S.O. sur plusieurs systèmes enzymatiques, en allant jusqu'à atteindre des concentrations de 50 à 60 p. 100 de D.M.S.O dans le milieu. Selon les enzymes essayés, cet auteur trouve soit une diminution progressive d'activité, soit une augmentation suivie de diminution (phosphomonoestérase d' *Helix pomatia*, trypsine), l'optimum étant atteint pour une concentration de 20 p. 100 environ en D.M.S.O, soit enfin une augmentation

constante (alanine déshydrogénase). Il est à noter que la lactate déshydrogénase, que nous avons également étudiée, était peu modifiée. D'un autre côté, les concentrations de D.M.S.O actives étaient beaucoup plus fortes que celles que nous avons employées pour les polymères, ce qui n'exclut pas la possibilité d'une action analogue. Le DMSO induit des changements de la conformation de certaines protéines, et cet effet a été attribué à la capacité de liaison du DMSO avec l'eau (RAMMLER, 1967).

Pour CHANG et SIMON (1968), c'est par l'intermédiaire d'une action sur les systèmes enzymatiques que le DMSO agirait sur la croissance cellulaire. Ces auteurs ont trouvé une inhibition de la croissance des cellules Hela et L, de E-Coli, du Mengovirus, du bactériophage T_4 . In vitro, DMSO augmente légèrement les activités de Rnase et β galactosidase, et diminue fortement celle de la glycéroldéshydrogénase.

Certes le DMSO, petite molécule très diffusible, est profondément différent des polymères que nous étudions. Il pourrait cependant être intéressant dans l'avenir de reprendre l'étude de ces derniers en choisissant les systèmes enzymatiques les plus sensibles au DMSO, comme l'alanine déshydrogénase, la trypsine, la glycéroldéshydrogénase, la glutamate déshydrogénase.

CHAPITRE IV

ACTION DES POLYMERES SUR LES HEMATIES

L'effet des polymères a été recherché sur des suspensions d'hématies, en vue de déterminer des actions éventuelles sur la membrane et sur le transport de l'eau vers la cellule. Différentes techniques ont été utilisées, en particulier la détermination du seuil d'hémolyse dans diverses solutions (résistance globulaire) et celle des variations du volume cellulaire. En général, les essais ont été faits sur des hématies provenant de deux espèces animales différentes : Rat et Homme, pour dépister des différences d'espèce éventuelles.

I.— RESISTANCE GLOBULAIRE A L'HEMOLYSE EN PRESENCE DES POLYMERES.

A) Techniques.

1.— Prélèvement du sang :

a) Homme : Le sang provient de donneurs bénévoles bien portants ; prélevé à une veine de l'avant-bras, il est recueilli sur héparine à raison de 60 U.I. pour 10 ml de sang, soit une goutte de soluté d'héparine à 5.000 U.I. (1 ml correspond à LXXXVII gouttes).

b) Rat : Les rats, de la souche Wistar CF du C.N.R.S. sont des mâles d'environ 350 à 400 g. L'animal est endormi par injection intramusculaire de 1,20 g/kg d'éthyluréthane. Une petite quantité d'héparine (environ 50 U.I.) est injectée par voie fémorale car le sang coagule très vite. Les carotides sont repérées ; l'une d'elles est dénudée, cathétérisée à l'aide d'une aiguille montée sur une seringue préalablement rincée à l'héparine et l'animal est saigné. On obtient ainsi 10 à 15 ml de sang que l'on recueille dans un flacon hépariné (1.000 U.I.), spécial pour prélèvement.

Dans des expériences précédentes, on recueillait le sang dans une solution ACD (1) sans héparine. Dans ces conditions, le saignement cesse très vite et on n'obtient pas plus de 5 à 6 ml de sang. Aussi toutes les expériences rapportées ici ont-elles été faites en traitant le Rat par l'héparine avant de le sacrifier.

Au lieu d'endormir le Rat à l'uréthane, des essais comparatifs préalables ont été faits sur le sang prélevé après anesthésie à l'éther. Aucune différences significatives n'a été observée. De même des essais pratiqués avec du sang de femelles Wistar n'ont pas montré de différence avec celui des mâles.

Le sang de Rat ainsi obtenu a un pH moyen de 7,37 à 37° C (valeurs extrêmes : 7,30 et 7,42). L'abaissement du point de congélation du plasma est en moyenne de - 0,63° C. Sur une série de 25 rats femelles on a eu un Δt moyen de - 0,637° C (écart-type : 0,03) ; sur une série de 31 rats mâles on a eu un Δt moyen de - 0,635° C (écart-type : 0,03). Le groupe, déterminé avec des réactifs pour le sang humain, a donné pour le Wistar CF mâle : AB Rh négatif. Nous avons rapporté précédemment d'autres détails sur ce sujet (DEBRAY et Coll, 1967 a).

(1) Solution ACD : acide citrique 1,66 g, soude 0,60 g, glucose 2 g, eau distillée Q.S. pour 100 ml.

2.- Etude de la résistance globulaire :

La résistance globulaire a été recherchée sur le sang total dans des solutions de CINA de 3 à 9 g p. 1.000, échelonnées de 0,5 en 0,5 g p. 1.000.

Dans une série de tubes à hémolyse on dépose 20 μ l de sang total hépariné (laissé au repos environ 1 heure après ponction) et l'on ajoute 4,8 ml de la solution saline. On agite doucement par retournement et l'on abandonne 30 mn ; trois séries analogues sont faites : à 37, 20 et 4° C. Après 30 mn les tubes sont de nouveau agités doucement puis centrifugés 2 mn à 4.000 t/mn. Le surnageant est prélevé et lu, sans dilution, au spectrophotomètre à 546 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'hémolyse par rapport à un témoin d'hémolyse totale effectuée dans de l'eau distillée.

La même technique a été employée pour toutes les mesures d'hémolyse, en remplaçant les solutions de CINA par les solutions pures ou mixtes des polymères ; le pH est toujours ajusté à 7,4.

Dans certains cas, des hématies lavées ont été utilisées. Après deux lavages, le culot globulaire résultant de la dernière centrifugation est dilué au volume convenable avec du soluté physiologique de même concentration que celui qui a servi au lavage (9 g/l pour l'Homme, 7 g/l pour le Rat).

B) Résultats :

1.- Hémolyse en solutions pures de polymères.

a) PF-68. Le tableau VIII indique les pourcentages d'hémolyse obtenus sur des hématies non lavées d'Homme et de Rat, avec des solutions pures de PF-68 dans l'eau distillée, le contact de 30 minutes étant effectué aux trois températures de 37, 20 et 4° C. Chaque chiffre du tableau représente la moyenne de cinq déterminations sur des échantillons de sang différents. On voit qu'à partir de la concentration 15 p. 100, l'hémolyse est sensiblement nulle, aussi bien avec les hématies humaines qu'avec celles du Rat (l'hémolyse résiduelle, toujours observée en CINA isotonique, est de l'ordre de 1 à 1,5 p. 100 chez l'Homme et de 2 à 5 p. 100 chez le Rat). La température de contact ne marque pas d'influence chez l'Homme, et nous avons cessé d'étudier ce facteur pour les autres polymères ; chez le Rat, l'hémolyse en solution à 10 p. 100 est plus marquée à 37° C qu'à 20 et 4° C. Nous avons discuté ailleurs cette question (DEBRAY et Coll., 1967 a)

Altérations des hématies et du plasma en présence de PF-68.

. α Sang total : Un examen macroscopique attentif montre que du sang humain total, mélangé à parties égales avec des solutions de PF-68 de 10 à 40 p. 100 dans l'eau ou le soluté de chlorure de sodium à 9 pour mille, subit une agglutination, d'autant plus marquée que la concentration en PF-68 est plus forte. Au microscope, on observe dans les agglutinats une disparition totale de la morphologie cellulaire ; les hématies sont remplacées par des amas anarchiques à haute teneur en hémoglobine et en protéines.

. β Plasma : Du plasma provenant de sang humain prélevé sur héparine ou sur une solution A.C.D. a été mélangé dans des proportions variables avec des solutions de PF-68 dans l'eau ou le soluté physiologique de CINA. On observe une précipitation des protéines lorsque la concentration de PF-68 dépasse 2 p. 100. Cette précipitation n'affecte pas uniquement le fibrinogène, mais également les autres protéines du plasma, car le phénomène se produit de la même façon avec le sérum. Il ne semble pas y avoir de phénomène de zone : la quantité de précipité formé augmente avec la concentration de PF-68 et elle augmente également avec la quantité de sérum présent pour une quantité donnée de PF-68.

. γ Hématies lavées : Pour éviter l'interférence de la précipitation des protéines plasmatiques dans l'estimation de l'action sur les hématies, des hématies ont été lavées 3 fois avec du soluté de chlorure de sodium à 9 pour mille.

L'examen microscopique montre que de telles cellules supportent bien une

ACTION HEMOLYTIQUE DE SOLUTIONS PURES DE POLYMERES SUR
DES HEMATIES D'HOMME ET DE RAT.

TABEAU VIII : PF 68

Concentration %	Hémolyse en pourcent à la température de :					
	37°C		20°C		4°C	
	Homme	Rat	Homme	Rat	Homme	Rat
10	20,2	14,7	20,0	6,2	16,5	6,5
15	4,8	4,4	2,3	2,0	2,9	0,9
20	1,4	1,3	2,3	1,6	0,9	0,4
25	0,6	2,2	4,6	3,5	1,4	3,6
30	0,2	5,8	2,3	4,5	2,1	4,2
35	1,0	2,2	1,9	3,3	1,6	2,9
40	0,2	0,9	2,5	1,8	4,4	1,3

TABEAU IX : PEG 6 000 et PVP II 000

CONCENTRATION %	Hémolyse en pourcent à 37° C			
	PEG 6000		PVP 11000	
	Homme	Rat	Homme	Rat
5	93,3	70,3	87,6	83,5
10	17,8	6,8	13,5	33,5
15	8,5	1,3	3,3	6,2
20	10,4	10,5	3,5	5,9

concentration de PF-68 allant jusqu'à 5 p.100 dans du soluté physiologique. Au-delà de cette concentration, des altérations cellulaires importantes surviennent, avec agglutination et quasi disparition des membranes. L'hémoglobine reste toutefois macroscopiquement dans le culot cellulaire et ne diffuse pas dans le surnageant, ce qui explique les résultats décrits plus haut.

b) PEG : Les données concernant des solutions pures de PEG sont portées dans le tableau IX, pour Homme et Rat, à 37° C. Chaque chiffre est la moyenne de cinq déterminations sur des échantillons de sang différents. Ici, encore, l'hémolyse cesse pratiquement à partir de la concentration 15 p. 100. Au-dessus de la concentration 20 p. 100, un trouble apparaît dans les tubes, qui gêne les lectures photométriques à 546 nm ; aussi les chiffres n'ont-ils pas été portés dans le tableau. Cependant, un examen à l'oeil nu permet d'affirmer d'après la couleur des surnageants que l'hémolyse est nulle ou sensiblement nulle.

c) PVP : Les résultats obtenus avec les solutions pures de PVP (tableau IX) sont sensiblement superposables à ceux donnés par le PEG. Ici encore, aux fortes concentrations, des troubles apparaissent dans les tubes ; ils subsistent après centrifugation modérée et faussent les lectures photométriques. L'examen à l'oeil nu indique l'absence d'hémolyse.

2.— Hémolyse en solutions mixtes polymères/CINa :

L'influence de quantités relativement faibles de polymères sur la résistance osmotique des hématies a été recherchée en traçant des courbes d'hémolyse en solutions mixtes contenant du chlorure de sodium (0,5 à 5 g/l par échelons de 0,5 g/l, avec des témoins 0 et 9 g/l) et l'un des polymères (0 à 5 p. 100 par échelons de 1 p. 100).

a) PF-68 : Les résultats obtenus en solution mixte PF-68-CINa sont résumés dans les tableaux X et XI en ce qui concerne l'action sur le sang total d'Homme et de Rat, à 37° C, et schématisés sur les figures 7 et 8. Les cases non remplies dans les tableaux indiquent des zones dans lesquelles les mesures n'ont pas été faites car elles ont été jugées inutiles d'après la zone de concentration étudiée, ou d'après les résultats des cases voisines.

L'addition aux solutés salins de quantités croissantes de PF-68 ne se traduit pas par un recul simple des valeurs de la résistance globulaire vers la zone de l'hypotonie, comme cela se produirait si la substance ajoutée avait un effet purement osmotique. Ici, une modification de la pente de la partie moyenne des courbes est observée ; elle peut être interprétée comme une variation dans la forme de la distribution des sensibilités individuelles des hématies à l'hypotonie, normalement gaussienne, et dont des courbes présentées constituent l'intégration (ROZE, 1966).

Les résultats obtenus avec les hématies du Rat sont substantiellement les mêmes ; la protection apportée par PF-68 contre l'hémolyse osmotique y est quantitativement un peu plus faible.

Pour voir si cet effet pouvait être dû à un certain type d'action sur la membrane, nous avons essayé de tracer des courbes analogues en utilisant à la place du sang total des hématies lavées au glucose isotonique. Un tel traitement, en effet, fragilise fortement les hématies humaines à l'hémolyse en CINa, comme le montre la figure 9, alors que les hématies de Rat sont peu modifiées, voire légèrement protégées par ce traitement (DEBRAY et Coll., 1967a). Le lavage a été fait avec du glucose à 100 g/l pour les hématies humaines et à 30 g/l pour celles du Rat. Ces concentrations ont été choisies comme isotoniques, c'est-à-dire ne donnant pas de changement de volume des hématies (voir : VAILLE et SOUCHARD, 1965). Les résultats sont rassemblés dans les tableaux XII et XIII et schématisés sur les figures 10 et 11.

On voit que l'effet du polymère subsiste, et qu'il paraît peu modifié par les lavages au glucose. Dans le cas du sang humain, l'ensemble des courbes se trouve

TABLEAU X

HEMOLYSE EN SOLUTIONS MIXTES PF 68-C1Na(sang total;
Homme; 30 min. à 37°C; hémolyse en pourcent du témoin
sans C1Na ni polymère; chaque chiffre est la moyenne de
dix mesures sur des échantillons différents).

C1Na g/l	PF-68 g p. 100 ml					
	0	1	2	3	4	5
0	100	-	100,6	83,9	102,5	79,6
0,5	-	-	-	-	-	62,8
1	-	-	-	-	-	31,3
1,5	-	-	-	-	-	22,5
2	-	-	79,9	52,2	16,4	20,0
2,5	-	-	77,8	43,2	11,4	14,6
3	100,5	80,9	70,0	46,2	4,2	7,9
3,5	95,3	74,7	45,6	44,4	2,7	2,8
4	61,7	28,3	36	3,0	2,5	2,8
4,5	5,9	1,9	0,2	3,4	3,0	2,7
5	0,8	0,9	0,2	1,6	2,7	2,8
9	0,2	1,2	0,7	3,1	2,8	3,3

TABLEAU XI

HÉMOLYSE EN SOLUTIONS: INTES PF-68-ClNa (sang total ; Rat ; même expression que Tab. X)

ClNa	PF-68 g p. 100 ml					
g/l	0	1	2	3	4	5
0	100	-	96,4	102,0	102,0	64,3
0,5	-	-	-	-	-	88,9
1	-	-	-	-	-	61,9
1,5	-	-	-	-	-	53,5
2	-	-	91,4	75,1	27,5	43,8
2,5	-	-	92,7	69,3	15,3	26,5
3	97,4	94,1	77,1	59,2	4,8	12,7
3,5	86,2	76,1	42,1	56,5	2,2	4,3
4	43,2	31,2	11,4	5,7	2,2	2,9
4,5	10,4	7,7	3,7	3,9	1,9	2,5
5	6,5	7,4	4,0	2,0	2,4	2,6
7	4,5	1,0	1,8	3,4	2,3	1,3

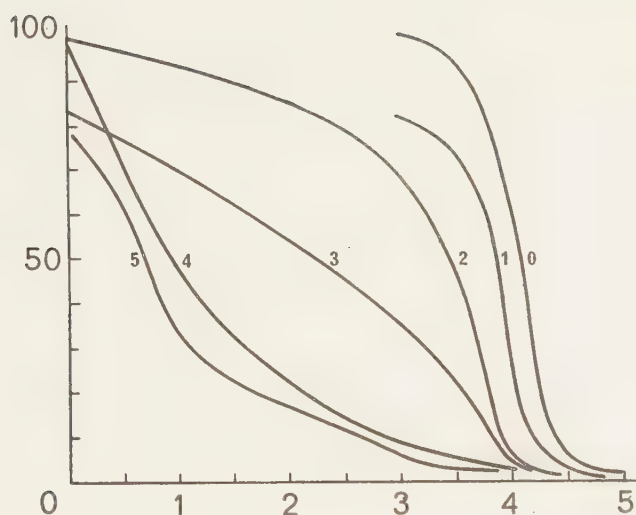


FIGURE 7: Résistance globulaire des hématies humaines en présence de quantités variables de PF 68 (0 à 5%; une courbe pour chaque dose). Les quantités de ClNa varient de 0,5 en 0,5 g/l. Pour chaque dose de ClNa et chaque dose de PF 68, le pourcentage moyen est déterminé sur dix mesures. Abscisses: ClNa, g/l; ordonnées: hémolyse en pourcentage de l'hémolyse totale en eau distillée.

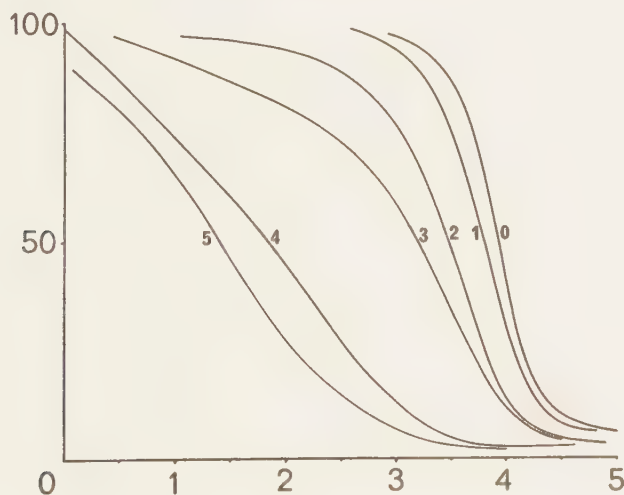


FIGURE 8: Résistance globulaire des hématies de Rat dans des solutions mixtes de ClNa et de PF 68. Mêmes échelles que figure 7.

TABLEAU XII

HEMOLYSE EN SOLUTIONS MIXTES PR-60 et CNa APRES LAVAGE DES MEMBRANES
AU SOLUTE DE GLUCOSE 100 g/l (sang humain ; même expression que

Tabl. X)

CNa g/l	PR-60 g p. 100 ml					
	0	1	2	3	4	5
0	100	110,5	91,8	95,0	99,2	100,4
2	96,8	89,0	76,8	58,4	45,0	32,9
2,5	-	-	-	56,9	39,0	28,2
3	93,6	84,4	73,9	52,5	35,1	24,8
3,5	-	-	-	48,7	31,0	21,9
4	92,9	83,2	68,6	44,9	28,5	18,6
4,5	91,9	-	55,9	34,4	16,1	6,5
5	88,5	67,3	38,3	22,6	12,0	4,5
5,5	65,6	-	21,3	16,9	8,3	1,2
6	42,8	25,3	10,8	6,1	5,1	1,0
6,5	25,5	10,4	4,4	5,7	2,8	1,9
7	0,7	5,7	2,3	2,9	2,2	1,5
9	0,7	2,7	1,2	2,8	2,5	1,2

TABLEAU XIII

HEMOLYSE EN SOLUTIONS MIXTES PF-68 et ClNa, APRES LAVAGE DES HEMATIES
 AU GLUCOSE 30 g/l (Sang de Rat ; même expression que Tab. X)

ClNa g/l	PF-68 g p. 100 ml					
	0	1	2	3	4	5
0	100	95,3	92,5	82,6	94,1	69,8
0,5	-	96,0	91,7	71,5	80,7	77,9
1	96,4	95,5	89,7	59,2	70,7	63,4
1,5	-	94,3	88,2	60,3	56,0	48,3
2	94,9	91,8	82,4	56,4	55,9	38,2
2,5	-	86,4	79,9	40,6	36,6	18,0
3	81,8	77,6	76,0	44,3	20,1	7,2
3,5	50,0	46,9	25,8	21,3	10,4	3,9
4	21,9	12,3	8,3	6,3	5,1	2,7
4,5	11,2	3,0	2,1	4,2	3,1	2,4
5	4,3	2,7	0,5	2,2	2,2	2,4
9	3,5	2,9	2,2	2,8	3,2	3,8

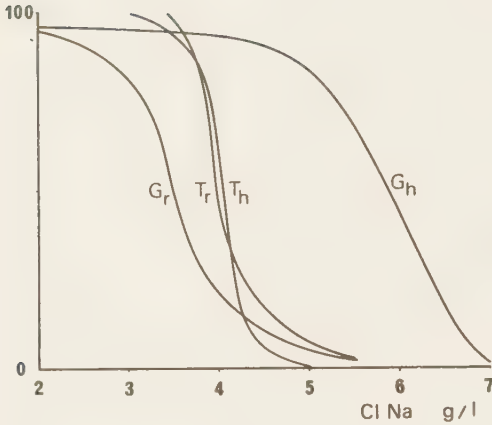


FIGURE 9: Influence du lavage au soluté glucosé à 30 (Rat) et 100 g/l (Homme) sur la résistance osmotique des hématies. T_r et T_h : courbes témoin sur sang total (Rat et Homme). G_r et G_h : courbes après lavage au glucose (Rat et Homme).

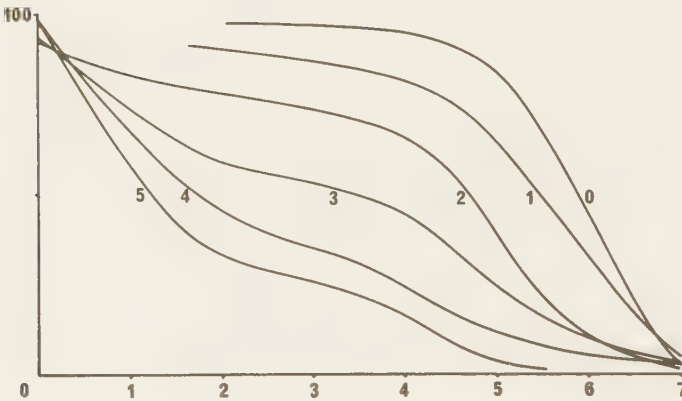


FIGURE 10: Courbes de résistance globulaire en solutions mixtes de ClNa et PF 68. Hématies humaines lavées au soluté glucosé 100 g/l. Echelles comme figure II.

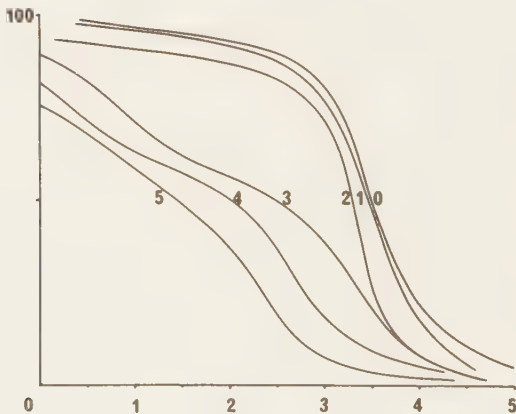


FIGURE 11: Courbes de résistance globulaire en solutions mixtes de ClNa et PF 68. Hématies de Rat lavées au soluté glucosé à 30 g/l. Abscisses: ClNa g/l; ordonnées: hémolyse en pourcent; une courbe pour chaque concentration de PF 68 (1 à 5 %).

déplacé vers les plus fortes concentrations de CINA, sans cependant que les points d'hémolyse quasi-totale soient beaucoup modifiés, ce qui a pour effet principal de donner une plus grande inclinaison de la famille de courbes vers l'horizontale. Le lavage au glucose semble avoir sur la population des hématies une action de différenciation, car la pente de la courbe de résistance globulaire témoin est plus faible que sur du sang total non lavé. Cela signifie que dans la population érythrocytaire, différentes fractions sont plus ou moins sensibilisées par le lavage, ce qui entraîne un élargissement de la courbe de distribution des sensibilités individuelles à l'hémolyse.

b) PEG : Les résultats observés dans les mêmes conditions que précédemment avec des solutions mixtes PEG-CINA sont résumés dans les tableaux XIV et XV respectivement pour les hématies d'Homme et de Rat, et sur les figures 12 et 13. L'examen des résultats montre qu'il existe un effet de recul des courbes d'hémolyse osmotique, apparemment analogue à celui constaté avec le PF 68, mais d'intensité un peu moindre. La concentration de 4 p. 100 en poids de PEG donne à peu près le même effet que la concentration 3 p. 100 en poids de PF 68. Si l'on tient compte du poids moléculaire, un peu plus élevé pour le PF 68 que pour le PEG, la différence s'accroît et l'effet par molécule devient environ deux fois plus accentué avec PF 68 qu'avec PEG 6000.

c) PVP : Les résultats obtenus en solutions mixtes PVP-CINA sont rapportés dans les tableaux XVI et XVII et les figures 14 et 15. L'examen des courbes montre qu'à concentration pondérales égale, le recul des courbes d'hémolyse est nettement plus faible avec la PVP qu'avec le PEG et surtout PF 68. En outre, on ne note pas, ou peu, l'effet de dispersion des sensibilités érythrocytaires individuelles à l'hémolyse qui se manifestait avec les deux autres polymères et se traduisait par une déformation rapide des courbes. Ici, les fronts des sigmoïdes restent raides aux alentours du point H50 (hémolyse 50 p. 100), tout au moins jusqu'à la concentration 4 p. 100, la pente n'étant que peu modifiée pour la concentration 5 p. 100, au moins dans le cas des hématies humaines.

3.- Relations entre point d'hémolyse 50 p. 100 et abaisséments cryométriques des solutions :

La mesure des abaisséments cryométriques de solutions pures de polymères a été rapportée au chapitre II. Nous avons trouvé que l'abaissement cryométrique n'est pas proportionnel à la concentration, mais qu'il devient de plus en plus fort lorsque la concentration s'accroît, lorsqu'on l'exprime sur une base de concentration unitaire (millièmes de degré par pour cent de concentration par exemple). Ce phénomène ne surprend pas les physico-chimistes, qui ne s'étonnent pas de ce qui peut se passer en solutions concentrées, mais on peut tout de même noter, de façon très simpliste :

1/ que cette variation se fait en sens inverse de ce qui est observé avec les électrolytes usuels (CINA par exemple), et 2/ que cette variation implique l'obtention d'abaisséments cryométriques assez élevés pour des solutions relativement peu concentrées en termes de concentration moléculaire. De telles solutions ont ainsi des abaisséments cryoscopiques voisins de ceux des solutions physiologiques, ce qui peut expliquer l'effet non hémolytique *in vitro* de ces solutions.

L'extrapolation à concentration nulle des valeurs cryométriques mesurées conduit par le calcul à évaluer des masses moléculaires nettement plus faibles que par d'autres méthodes.

Pour continuer à explorer les relations entre abaissement cryométrique et taux d'hémolyse en présence de polymères, nous avons déterminé, d'après nos courbes de résistance globulaire, la composition interpolée des solutions mixtes polymères/CINA ayant donné 50 pour cent d'hémolyse.

Nous avons ensuite préparé de telles solutions et déterminé leur point cryo-

TABLEAU XIV

HEMOLYSE EN SOLUTIONS MIXTES PEG-C1Na (Sang total ; Homme ; 30 minutes
à 37°C ; hémolyse en p. 100 ; moyennes de dix mesures)

C1Na g/l	P E G g p. 100 ml					
	0	1	2	3	4	5
0	100	93,9	92,1	97,4	95,9	96,3
0,5	-	-	-	-	92,5	83,1
1	-	-	-	-	81,4	44,0
1,5	-	-	90,7	86,4	65,4	25,2
2	-	-	89,8	84,1	55,0	18,2
2,5	100,8	92,0	90,6	84,5	48,1	14,2
3	96,2	90,6	85,8	75,1	48,3	7,7
3,5	91,7	84,4	81,9	45,0	13,9	8,3
4	59,5	40,0	17,8	3,8	0,5	0,1
4,5	7,1	5,8	0,9	0,1	-	-
9	1,3	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1

TABEAU XV

HEMOLYSE EN SOLUTIONS MIXTES PEG-ClNa (sang total ; Rat ; 30 minutes
à 37°C ; hémolyse en p. 100 de l'hémolyse totale ; moyennes de dix
mesures).

ClNa g/l	P E G g p. 100 ml					
	0	1	2	3	4	5
0	100	95,3	95,7	84,4	61,2	54,1
0,5	-	-	-	-	85,4	64,2
1	-	-	-	-	81,9	66,1
1,5	-	-	94,8	76,6	68,8	54,5
2	-	-	94,7	72,5	53,7	37,7
2,5	103,2	91,8	95,5	78,5	42,9	22,7
3	95,4	87,6	87,5	65,4	23,9	10,1
3,5	82,5	64,9	63,1	45,8	11,7	3,5
4	40,3	20,2	18,9	18,4	3,8	2,3
4,5	10,5	3,5	4,7	9,6	-	-
7	4,7	2,6	2,1	4,5	2,1	2,5

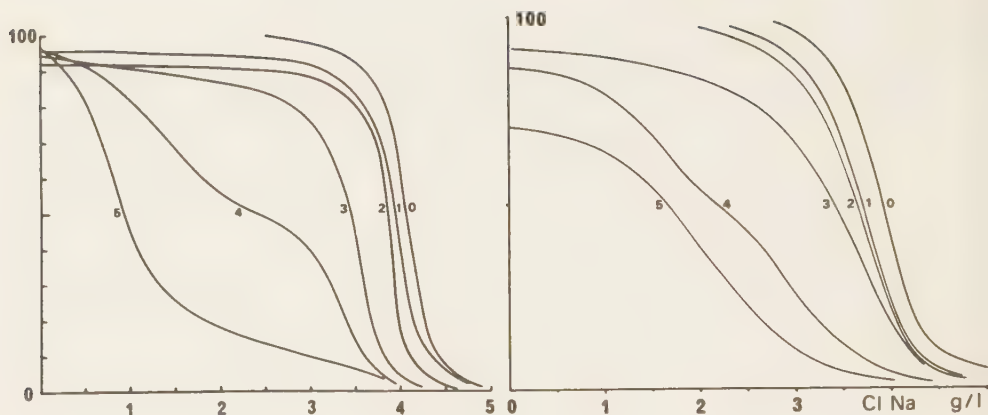


FIGURE 12:Hématies humaines.FIGURE 13:Hématies de Rat.

Résistance globulaire des hématies en présence de quantités variables de PEG 6 000 (0 à 5%, une courbe pour chaque concentration).Abscisses: ClNa, g/l; ordonnées, hémolyse en pourcent.

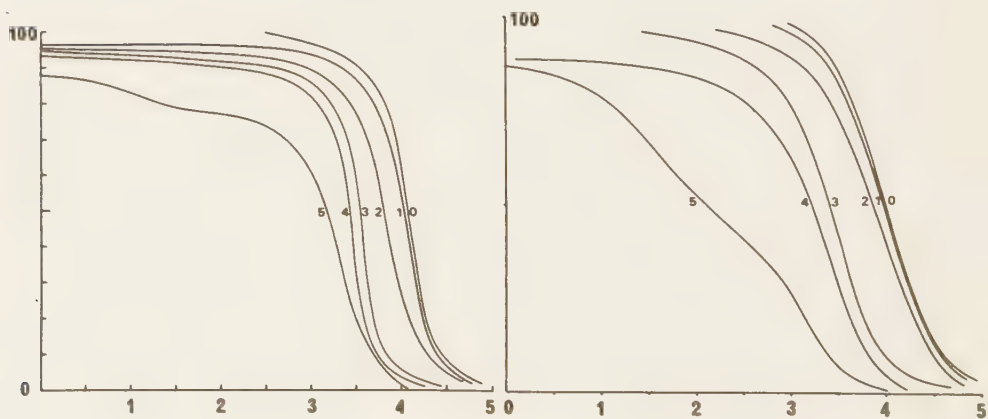


FIGURE 14:Hématies humaines.FIGURE 15:Hématies de Rat.

Résistance globulaire des hématies en présence de quantités variables de PVP 11000 (mêmes échelles que figure 12). Le recul des courbes est moins net qu'avec les autres polymères, surtout pour les hématies humaines.

TABLEAU XVI

HEMOLYSE EN SOLUTIONS MIXTES PVP-ClNa (sang total ; Homme ; 30 minutes à 37°C ; hémolyse en p. 100 de l'hémolyse totale; moyennes de dix mesures).

ClNa g/l	P V P g p. 100 ml					
	0	1	2	3	4	5
0	100	96,0	94,9	94,2	93,5	86,2
0,5	-	96,0	95,4	95,2	92,8	86,0
1	-	-	-	-	91,6	82,6
1,5	-	-	93,0	92,0	89,3	78,7
2	-	-	92,1	89,5	87,9	77,0
2,5	100,2	93,0	90,0	88,1	85,7	73,9
3	96,2	94,0	92,0	89,4	84,8	60,6
3,5	91,7	88,0	77,2	57,5	35,7	21,1
4	59,5	53,7	28,0	6,4	3,2	0,1
4,5	7,1	8,8	3,5	0,2	-	-
9	1,3	0,4	0,1	0,1	0,2	0,1

TABLEAU XVII

HÉMOLYSE EN SOLUTIONS MIXTES PVP-ClNa (sang total ; Rat ; 30 minutes à 37°C ; hémolyse en p. 100 de l'hémolyse totale ; moyennes de dix mesures)

ClNa g/l	P V P g p. 100 ml					
	0	1	2	3	4	5
0	100	96,6	92,8	90,6	82,2	85,8
0,5	-	99,0	96,6	95,6	88,3	84,5
1	-	-	-	-	87,0	79,7
1,5	-	-	95,4	89,7	86,5	66,2
2	-	-	92,8	91,5	80,4	49,4
2,5	103,2	97,8	91,4	89,7	74,9	39,0
3	95,4	95,5	90,3	77,9	63,7	27,2
3,5	82,5	84,4	73,4	42,6	28,3	2,8
4	40,3	48,6	40,5	6,9	3,0	0,1
4,5	10,5	12,8	5,3	2,9	-	-
7	4,7	2,3	1,8	2,5	1,4	0,5

métrique. La composition des solutions ainsi que les résultats observés sont donnés dans le tableau XVIII. On voit que les solutions donnant 50 p. 100 d'hémolyse n'ont pas toutes le même abaissement cryoscopique : Le Δt est sensiblement 2 fois plus faible avec PF 68 et PEG 6000 lorsque le polymère est en forte concentration par rapport au chlorure de sodium. Dans le cas de la PVP, au contraire, le Δt s'accroît pour la dose 50 p. 100 hémolysante, lorsque la concentration du polymère augmente.

II.— VARIATIONS DE VOLUME EN SOLUTIONS MIXTES DE POLYMERES ET DE CHLORURE DE SODIUM

Nous avons vu plus haut que l'addition de polymères à des solutions de chlorure de sodium faisait reculer le point d'hémolyse 50 p. 100 de façon parfois nettement supérieure à ce que laisserait prévoir l'effet osmotique attendu d'après le poids moléculaire, ou estimé d'après l'abaissement cryométrique. On a donc recherché un effet éventuel direct sur la membrane en mesurant dans les mêmes conditions les variations de volume des érythrocytes. Si les variations de volume s'avèrent parallèles aux variations du point H50, on en déduira qu'il s'agit réellement d'un effet de nature osmotique ; si une dissociation est notée entre volume et hémolyse (avec par exemple un volume moyen plus élevé pour le point H50) on pourra évoquer une action membranaire directe avec consolidation apparente de cette membrane.

A) Technique :

On utilise la méthode de l'hématocrite. Les hématies d'Homme et de Rat sont séparées du plasma par centrifugation (10 mn à 700 g). Le plasma séparé est conservé pour effectuer un hématocrite témoin, donnant le volume "normal" des hématies. 1 ml de purée globulaire est mélangé à 1 ml de solution à étudier ; après agitation douce, le mélange est transporté dans un tube de Wintrobe et centrifugé 30 min. à 3000 g environ. Le volume globulaire est lu en pourcentage du volume total.

Dans certain groupes expérimentaux, on a tenté d'employer une méthode de microhématocrite en tube capillaire, pour réduire les volumes de sang utilisés, ce qui est très important dans le cas du Rat. Les suspensions d'hématies sont alors transférées dans des capillaires héparinés à microhématocrite (1), qui sont soudés à la flamme, puis coupés à la longueur adéquate pour entrer dans les portoirs de la centrifugeuse du système micro-analytique Beckman-Spinco. On centrifuge 3 minutes à la vitesse unique de cette centrifugeuse, puis on mesure avec une règle graduée les hauteurs relatives du liquide total et des hématies. Cette méthode ne nous a pas donné de résultats suffisamment reproductibles et nous l'avons abandonnée. PHILIPPOT (1962) a discuté la valeur de l'hématocrite pour l'évaluation du volume globulaire. Il semble que, pour des champs centrifuges de l'ordre de 1500 g, le volume de plasma piégé ne soit pas négligeable. Par contre, au dessus de 4000 g, le volume de plasma piégé ne dépasse pas 2 p. 100. Nos conditions d'expérience correspondent à une accélération de 3000 g environ. De plus les expériences sont comparatives, ce qui laisse espérer une assez bonne estimation du volume. Il n'est pas recommandé de trop augmenter le champ centrifuge, car l'hémolyse risque alors d'apparaître.

B) Résultats.

Les mélanges suivants ont été étudiés : 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 et 1 p.100 de ClNa, associé dans chaque cas à 0, 1, 2, 3, 4 et 5 p. 100 de chaque polymère. Pour la concentration 0,2 p. 100 de ClNa, une hémolyse partielle s'est pratiquement toujours manifestée, et nous n'avons pas retenu les valeurs de volume

(1) BECKMAN FRANCE, 71 rue Max Dormoy, Paris 18ème.

TABEAU XVIII : Abaissement cryoscopique de solutions mixtes de ClNa et PF-68, PEG 6.000 ou PVP 11.000 donnant 50 % d'hémolyse avec les hématies humaines (moyennes et écarts-types ; groupes de 5 mesures).

Mélange de PF-68 + ClNa		Δt (°C)		Mélange de PEG 6.000 + ClNa		Δt (°C)		Mélange de PVP 11.000 + ClNa		Δt (°C)	
p. cent	p. mille:			p. cent	p. mille:			p. cent	p. mille:		
1	3,9	- 0,273		1	3,9	- 0,294		1	4	- 0,297	
		$\pm 0,012$				$\pm 0,003$				$\pm 0,002$	
2	3,4	- 0,256		2	3,9	- 0,293		2	3,8	- 0,298	
		$\pm 0,008$				$\pm 0,007$				$\pm 0,002$	
3	2,5	- 0,211		3	3,5	- 0,270		3	3,5	- 0,326	
		$\pm 0,012$				$\pm 0,004$				$\pm 0,007$	
4	1	- 0,113		4	2,4	- 0,225		4	3,4	- 0,335	
		$\pm 0,008$				$\pm 0,005$				$\pm 0,005$	
5	0,7	- 0,117		5	0,9	- 0,136		5	3,2	- 0,361	
		$\pm 0,005$				$\pm 0,005$				$\pm 0,009$	

correspondantes, faussées par la perte cellulaire due à l'hémolyse. Pour chaque polymère, les résultats moyens se présentent donc sous la forme d'un tableau à six colonnes et à quatre lignes, les colonnes correspondant aux différentes concentrations du polymère, et les lignes aux différents taux de ClNa. Le mode d'expression retenu pour les résultats est V/V_0 , expression dans laquelle V_0 représente le volume des globules dans leur propre plasma, et V le volume dans la solution considérée. Une dizaine d'échantillons de sangs différents sont étudiés dans chaque cas. Les tableaux XIX, XX, XXI et XXII résument les résultats obtenus. On y a joint un paramètre statistique qui est ici l'intervalle de confiance, c'est-à-dire $t.s_m$, le produit de l'erreur-type de la moyenne par la variable t de Student pour le nombre de degrés de liberté considéré, au seuil de confiance 0,05.

Dans le cas de ces mesures, en effet, une étude statistique s'avère nécessaire. Pour l'exploitation des résultats, la première étape a été le tracé de familles de courbes représentant les variations de volume soit en fonction de la concentration de ClNa (une courbe pour chaque concentration de polymère), soit en fonction de la dose de polymère (avec une courbe pour chaque dose de ClNa). Le tracé de ces familles de courbes montre que la variation de V/V_0 est sensiblement linéaire en fonction de l'inverse de la concentration en ClNa, comme il est établi classiquement (voir par exemple : PONDER, 1948, PHILIPPOT, 1962, BENEZECH, 1962). Ces familles de courbes sont à pente assez forte chez l'Homme, beaucoup moins forte chez le Rat, relativement enchevêtrées, et permettent difficilement d'évaluer l'effet des polymères. Par contre, le tracé de V/V_0 en fonction de la concentration de polymère, avec une courbe pour chaque concentration de ClNa, donne une famille de courbes proches de l'horizontale et bien séparées les unes des autres. Deux abscisses ont été employées : l'une linéaire en concentration des polymères, l'autre linéaire en fonction de l'inverse de la concentration. Le choix de l'abscisse inverse n'apporte aucun avantage évident pour la linéarité, et les tracés obtenus suggèrent que, si une variation de volume significative existe réellement pour les doses de polymères testées, elle est sensiblement proportionnelle à la concentration. Cette variation hypothétique ne paraît pas s'accorder avec un effet osmotique vrai pour une substance non pénétrante, c'est-à-dire mettant seulement en jeu des transferts d'eau. Cette variation méritait d'être étudiée avec soin et nous avons tenté de répondre aux questions suivantes :

1/ La variation de volume existe-t-elle ?

2/ Est-elle reliée à la concentration de polymère par une loi linéaire ou non linéaire ?

Pour répondre à ces questions nous avons calculé les équations des droites de régression volume/concentration du polymère pour la famille des courbes dont chaque individu correspond à une concentration en chlorure de sodium déterminée. On teste ensuite la signification de la pente par rapport à zéro, et la signification des termes non linéaires éventuellement présents. Le calcul a été fait manuellement en utilisant les coefficients polynomiaux.

Pour cela les données doivent être présentées convenablement. Pour employer les coefficients polynomiaux, il faut que les groupes soient régulièrement espacés en X , ce qui est le cas, et de même nombre, ce qui est également le cas (une pondération des valeurs de dispersion permet d'homogénéiser les nombres dans le cas de groupes légèrement inégaux, en supposant les variances constantes dans chaque groupe).

On appellera Y les volumes par rapport au témoin plasma (V/V_0) et X les concentrations en polymère (en g/100 ml). Pour chaque concentration de ClNa, on a 6 valeurs de X : 0, 1, 2, 3, 4 et 5, que l'on peut remplacer par les coefficients polynomiaux suivants : -5, -3, -1, 1, 3, 5

VARIATIONS DE VOLUME DES HEMATIES DANS DES SOLUTIONS MIXTES ClNa ET PF-68 (V/V₀). Moyennes de 10 mesures et intervalle de confiance 0,05 des moyennes.

TABLEAU XIX: Hématies humaines

ClNa	PF-68 g/100 ml					
g/100 ml	0	1	2	3	4	5
0,4	1,298 ± 0,044	1,294 ± 0,023	1,290 ± 0,019	1,261 ± 0,029	1,264 ± 0,035	1,222 ± 0,038
0,6	1,166 ± 0,027	1,092 ± 0,028	1,105 ± 0,022	1,072 ± 0,031	1,105 ± 0,038	1,070 ± 0,028
0,8	1,046 ± 0,027	0,997 ± 0,017	0,996 ± 0,016	0,979 ± 0,029	1,012 ± 0,024	0,971 ± 0,036
1	0,939 ± 0,033	0,933 ± 0,015	0,925 ± 0,014	0,917 ± 0,019	0,931 ± 0,023	0,910 ± 0,032

TABLEAU XX: Hématies de Rat.

ClNa	PF-68 g/100 ml					
g/100 ml	0	1	2	3	4	5
0,4	1,097 ± 0,085	1,114 ± 0,054	0,994 ± 0,048	1,043 ± 0,050	1,016 ± 0,063	1,076 ± 0,061
0,6	1,047 ± 0,064	0,980 ± 0,028	0,922 ± 0,051	0,925 ± 0,040	0,910 ± 0,076	0,953 ± 0,056
0,8	0,961 ± 0,059	0,866 ± 0,026	0,868 ± 0,029	0,875 ± 0,029	0,864 ± 0,059	0,837 ± 0,043
1	0,890 ± 0,082	0,879 ± 0,029	0,864 ± 0,034	0,861 ± 0,034	0,846 ± 0,047	0,815 ± 0,044

VARIATIONS DE VOLUME DES HEMATIES HUMAINES DANS DES
SOLUTIONS MIXTES ClNa-POLYMERES (V/V). Moyennes de 10
mesures et intervalle de confiance 0,05 des moyennes.

TABLEAU XXI: PEG 6000

ClNa g/100 ml	PEG 6000 g/100 ml					
	0	1	2	3	4	5
0,4	1,298 ± 0,044	1,263 ± 0,062	1,260 ± 0,028	1,276 ± 0,003	1,231 ± 0,024	1,227 ± 0,025
0,6	1,166 ± 0,027	1,127 ± 0,027	1,114 ± 0,024	1,114 ± 0,014	1,092 ± 0,014	1,074 ± 0,035
0,8	1,048 ± 0,027	0,993 ± 0,027	1,010 ± 0,036	0,986 ± 0,025	0,981 ± 0,021	0,980 ± 0,033
1	0,939 ± 0,033	0,927 ± 0,030	0,940 ± 0,047	0,911 ± 0,030	0,891 ± 0,028	0,900 ± 0,016

TABLEAU XXII: PVP II 000

ClNa g/100ml	PVP 11 000 g/100 ml					
	0	1	2	3	4	5
0,4	1,298 ± 0,044	1,303 ± 0,036	1,293 ± 0,032	1,270 ± 0,035	1,242 ± 0,017	1,248 ± 0,015
0,6	1,166 ± 0,027	1,123 ± 0,025	1,129 ± 0,027	1,111 ± 0,025	1,082 ± 0,016	1,107 ± 0,020
0,8	1,048 ± 0,027	1,019 ± 0,038	0,990 ± 0,043	1,024 ± 0,023	0,979 ± 0,017	0,990 ± 0,018
1	0,939 ± 0,033	0,923 ± 0,029	0,941 ± 0,041	0,942 ± 0,022	0,915 ± 0,014	0,893 ± 0,020

On aura donc : nombre par groupe : 10 (désigné sous le signe r) ; nombre de groupes : 6 ; nombre total de données par courbe : 60.

Rappelons que la somme des X abrégés (coef. polynomiaux) doit être égale à 0 (LISON, 1958). Les coefficients seront appelés k . Si leur somme (et donc leur moyenne) est nulle, Sx^2 est égale à la somme des carrés des k (Sk^2). Pour le calcul de Sxy , la simplification est plus grande encore : $S(X - \bar{X})(Y - \bar{Y})$ devient $Sxy = Sk Y$.

La somme des carrés pour la régression linéaire vaut : $\frac{(Sk Y)^2}{r Sk^2}$, et le coefficient de régression $b = \frac{2 Sk Y}{r Sk^2}$ (le coefficient 2 au numérateur intervient parce que les coefficients k sont espacés de 2 en 2 lorsqu'il y a six groupes).

Pour le calcul des termes quadratique et cubique de la régression, on peut utiliser les coefficients suivants :

Groupe N°	Degré du polynôme			
	1	2	3	4
1	-5	5	-5	1
2	-3	-1	7	-3
3	-1	-4	4	2
4	1	-4	-4	2
5	3	-1	-7	-3
6	5	5	5	1
Diviseur (Sk^2)	70	84	180	28

Les tableaux XXIII, XXIV et XXV donnent l'exemple des calculs pour la régression dans le cas du PF-68 + 0,4 p. 100 de CINA, hématies humaines. Ce sont là des tableaux de travail qui ne sont reproduits qu'à titre d'exemple. Ils sont établis de la même façon pour chaque courbe étudiée (16 droites de régression au total ont été calculées, soit 48 tableaux, qu'il n'est évidemment pas question de reproduire in extenso).

La pente des droites de régression est calculée au niveau des tableaux du type XXIV, et d'après les unités choisies, elle correspond à la variation de V/V_0 par pour cent de concentration de PF-68, pour un niveau donné de la concentration en CINA. Le terme constant (a) de l'équation, est calculé d'après $a = \bar{Y} - b\bar{X}$, ou $\bar{Y}$ est la moyenne des Y , et $\bar{X}$ la moyenne des X réels (c'est-à-dire ici 2,5). Le tableau XXVI résume les valeurs trouvées pour les équations des droites de régression pour PF-68 (Homme et Rat), PEG 6000 (Homme) et PVP 11000 (Homme). Le tableau XXVII donne les résultats des tests de signification pour les termes linéaires, quadratique et cubique de la régression. Ces tests sont les plus importants à considérer d'abord car c'est sur eux que l'on doit se baser pour établir s'il y a réellement une régression, et si cette régression est plus vraisemblablement linéaire ou vraisemblablement plus complexe.

L'examen du taux de signification du poste "régression linéaire" permet de déterminer si la pente b de la droite passant au mieux entre les points expé-

TABLEAU XXIII: Fac-similé d'une feuille de travail pour l'analyse de variance.

PF-68 + ClNa 0,4 % - Homme

PF-68 % en plus de ClNa 0,4 %						
Groupes	0	1	2	3	4	5
$\bar{X}$	12,98	12,94	12,90	12,61	12,64	12,22
n	10	10	10	10	10	10
M	1,298	1,294	1,290	1,261	1,264	1,222
$\sum X^2$	16,8836	16,7540	16,6472	15,9157	15,9982	14,9619
$TC = \frac{(\sum X)^2}{n}$	16,8480	16,7443	16,6410	15,9012	15,9769	14,9328
$\sum x^2$	0,0356	0,0097	0,0062	0,0145	0,0213	0,0291
S^2						

Total Général $\sum X_t$ = 76,29 M = 1,271

Nombre total n_t = 60

$\sum X^2$ totale $\sum X_t^2$ = 97,1606

TC global $\frac{(\sum X_t)^2}{n_t}$ = 97,0027

S (TC partiels) = 97,0442

a - Variation globale					
$\sum X_t^2 - TC$ global	0,1579	D.L.	Carré moyen	F	P
b - Variation entre groupes					
S (TC partiels) - TC global	0,0415	5	0,00830	3,86	0,01
c - Variation dans les groupes					
Totale - Entre groupes	0,1164	54	0,00215		

TABLEAU XXIV - Calcul de la pente de la droite de régression.

PF-68 + C11a 0,4 % - Poivre

Terme	Coefficients k						Diviseur	SkY	$\frac{(SkY)^2}{rSk^2}$
Linéaire	- 5	- 3	- 1	1	3	5	700	- 4,99	0,03557
Quadratique	5	- 1	- 4	- 4	- 1	5	240	- 1,62	0,00312
Cubique	- 5	7	4	- 4	- 7	5	1.800	- 0,54	0,00016
Totaux (Y)	12,98	12,94	12,90	12,61	12,64	12,22			

$$b = 2 \frac{SkY}{rSk^2} = - 0,0142 \quad (\text{variation de } V/V_0 \text{ par pourcent de PF-68})$$

TABLEAU XXV : Calcul des seuils de signification pour les différents termes de la régression.

PF-68 + ClNa 0,4 % - Homme

Source de variation	Somme des carrés	D.L.	Carré moyen (x10 ⁵)	F	P
<u>Régression entre groupes</u>					
Terme linéaire	0,03557	1	3.557	16,54	0,001
Terme quadratique	0,00512	1	312	1,45	N.S.
Terme cubique	0,00016	1	16	< 1	N.S.
Autres termes	0,00235	2	132	< 1	N.S.
<u>Erreur</u>	0,11640	54	215		
TOTAUX	0,15790	59			

TABLEAU XXVI

EQUATIONS DES DROITES DE REGRESSION $V/V_0 = (f)$ DE CONCENTRATION ENPOLYMER

Nature du polymère et des hématies	Concentration: en ClHa g/100 ml	Equation de la droite pour V/V_0 prévu en fonction de X = concentration p.100 du polymère ($0 \leq X \leq 5$)
PF-68	0,4	$1,306 - 0,0142 X$
Homme	0,6	$1,134 - 0,0135 X$
	0,8	$1,025 - 0,0102 X$
	1	$0,936 - 0,0045 X$
PF-68	0,4	$1,081 - 0,0100 X$
Rat	0,6	$1,004 - 0,0193 X$
	0,8	$0,923 - 0,0151 X$
	1	$0,893 - 0,0136 X$
PEG 6000	0,4	$1,290 - 0,0124 X$
Homme	0,6	$1,154 - 0,0161 X$
	0,8	$1,027 - 0,0114 X$
	1	$0,941 - 0,0094 X$
PVP 11000	0,4	$1,307 - 0,0130 X$
Homme	0,6	$1,150 - 0,0124 X$
	0,8	$1,036 - 0,0109 X$
	1	$0,943 - 0,0072 X$

RESULTATS DES TESTS DE SIGNIFICATION POUR LES REGRESSIONS DU VOLUME SUR LA TENEUR EN POLYMERES

Nature des polymères et des hématies	Concentration en CINA g/100 ml	Différence entre groupes	Régression linéaire	Régression quadratique	Régression cubique	Régression: autres termes
PF-68 Homme	0,4	0,01	0,001	N.S.	N.S.	N.S.
	0,6	0,001	0,001	0,05	0,05	N.S.
	0,8	0,001	0,001	N.S.	0,05	N.S.
	1	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
PF-68 Rat	0,4	0,01	N.S.	0,01	N.S.	N.S.
	0,6	0,001	0,001	0,001	N.S.	N.S.
	0,8	0,01	0,001	0,05	N.S.	N.S.
	1	N.S.	0,01	N.S.	N.S.	N.S.
PEG 6000 Homme	0,4	0,05	0,01	N.S.	N.S.	N.S.
	0,6	0,001	0,001	N.S.	N.S.	N.S.
	0,8	0,01	0,001	N.S.	N.S.	N.S.
	1	N.S.	0,01	N.S.	N.S.	N.S.
PVP 11000 Homme	0,4	0,05	0,001	N.S.	N.S.	N.S.
	0,6	0,001	0,001	0,05	N.S.	N.S.
	0,8	0,05	0,001	N.S.	N.S.	N.S.
	1	0,05	0,05	N.S.	N.S.	N.S.

rimentaux est ou non significativement différente de zéro (si b n'est pas différent de zéro, il n'y a pas de régression : c'est-à-dire pas d'influence proportionnelle de la dose de polymère sur la variation du volume).

On observe que la probabilité de régression linéaire est très bonne dans presque tous les cas, à l'exception des associations PF-68, CINA 1 p. 100, hématies humaines, et PF-68, CINA 0,4 p. 100, hématies de Rat.

Les termes supérieurs de la régression sont non significatifs dans tous les cas avec le PEG 6000, et l'éventualité d'une relation linéaire est donc la plus probable à considérer dans ce cas. Il en va pratiquement de même avec la PVP 11000, à l'exception d'un terme quadratique significatif sur la courbe correspondant à 0,6 p. 100 de CINA.

Avec PF-68 et hématies humaines, on note deux fois un terme cubique et une fois un terme quadratique significatifs.

Avec PF-68 et hématies de Rat, les écarts à la linéarité sont beaucoup plus importants, puisque l'on trouve trois fois des termes quadratiques significatifs à très significatifs et une fois même une régression sans terme linéaire, avec uniquement un terme quadratique significatif.

Par la suite nous avons cessé d'étudier les hématies de Rat, non pas en raison de ces résultats, mais parce que leur variation de volume en fonction de la concentration de CINA est beaucoup plus faible que celle des hématies humaines, ce qui conduit à un mauvais rapport dispersion/variations dues aux produits étudiés. On peut s'attendre en effet à ce que la variation de volume, faible avec CINA, soit petite également avec d'autres substances.

III. — RELATIONS ENTRE VOLUME CELLULAIRE ET SEUIL D'HEMOLYSE

La constatation d'un effet des polymères sur la position du point d'hémolyse 50 p. 100 et d'un effet, léger mais significatif sur le volume cellulaire, impose de comparer l'ordre de grandeur de ces deux actions, de manière à établir si elles sont aussi intenses l'une que l'autre, ce qui impliquerait un mécanisme osmotique normal, ou différentes l'une de l'autre, ce qui amènerait à discuter d'un mécanisme particulier pour les polymères.

Pour effectuer cette comparaison, nous avons calculé les quantités de chlorure de sodium produisant des effets équivalents à ceux des polymères dans le cas de l'hémolyse et dans le cas du volume. Nous ne retiendrons ici que les résultats concernant les hématies humaines.

Pour l'hémolyse on se base sur la détermination du point H50. En solutions pures de chlorure de sodium, ce point est atteint avec 4,1 g/l de CINA. On lit sur les courbes que le même point est atteint pour :

3,9 g/l de CINA + 1 p. 100 de PF-68, pour 3,45 g/l de CINA + 2 p. 100 de PF-68, etc... (voir tableau XXVIII). Le premier chiffre de chaque case indique la valeur réelle observée. Le deuxième chiffre représente la quantité de CINA que le polymère a remplacé ; il est obtenu par différence avec la quantité de CINA donnant H50 à elle seule, c'est-à-dire 4,1 g/l. Le troisième chiffre de chaque case représente la masse de CINA équivalente à 1 g de polymère dans les conditions de l'expérience.

Un calcul du même genre est effectué sur les droites de régression représentant au mieux les variations de volume.

Pour une certaine concentration de CINA, on peut lire sur ces graphiques le volume relatif observé pour les concentrations zéro en polymère et pour la concentration 5 p. 100. On obtient ainsi les données du tableau XXIX (qui en fait n'ont pas été lues sur le graphique, mais calculées d'après les équations du tableau XXVI, ce qui évite les erreurs de lecture). On note sur ce tableau que les chiffres correspondant à la teneur nulle en polymère, qui devraient être théoriquement identiques, sont légèrement différents. Cela tient à ce que chaque droite

TABLEAU XXVIII: Calcul de l'équivalence en ClNa des concentrations de polymères, vis-à-vis de l'hémolyse in vitro
(point H 50) aux divers niveaux de concentration.

ClNa g/l en plus de polymères % pour obtenir H 50						
polymère %	0	1	2	3	4	5
PF-68		3,90	3,45	2,50	0,95	0,70
	4,10	0,20	0,65	1,60	3,15	3,40
		0,20	0,32	0,53	0,79	0,68
PEG 6000		3,95	3,85	3,45	2,40	0,95
	4,10	0,15	0,25	0,85	1,70	3,15
		0,15	0,12	0,28	0,42	0,63
PVP 11000		4,05	3,85	3,55	3,40	3,15
	4,10	0,05	0,25	0,55	0,70	0,95
		0,05	0,12	0,18	0,17	0,19

TABIEAU XXIX : Evaluation de la variation moyenne de volume provoquée par 5 p. 100 de polymère, à différents niveaux de concentration en ClNa .

Polymère	%	ClNa	%	
PF-68	0	1,134	0,6	1,0
	5	1,235	1,025	0,936
PEG 6000	0	1,154	0,974	0,913
	5	1,031	1,027	0,941
PVP 11000	0	1,150	0,970	0,894
	5	1,242	1,036	0,943
			0,981	0,906

TABIEAU XXX : Quantités de ClNa correspondant à 5 p. 100 de polymère dans chaque situation (hématies humaines)

Polymère	Niveau en ClNa (%)		
	0,4	0,6	0,8
PF-68	0,492 - 0,381 = 0,111	0,765 - 0,650 = 0,115	0,934 - 0,844 = 0,090
PEG 6000	0,829 - 0,412 = 0,417	0,755 - 0,620 = 0,135	0,942 - 0,836 = 0,106
PVP 11000	0,484 - 0,376 = 0,108	0,728 - 0,624 = 0,104	0,921 - 0,819 = 0,112
			1,050 - 1,006 = 0,044
			1,086 - 0,995 = 0,091
			1,063 - 0,991 = 0,072

est calculée avec des données différentes.

On peut par ailleurs tracer la courbe reliant le volume à la concentration en ClNa, en l'absence de polymère. On peut sur cette courbe reporter les valeurs du tableau XXIX et en déduire les quantités de ClNa qui remplaceraient à chaque fois les 5 p. 100 de polymère. On trouve ainsi les données du tableau XXX. Pour tenir compte de tous les résultats, le plus simple est d'en faire simplement la moyenne arithmétique. On trouve ainsi que 5 g de polymère remplacent environ : 0,090, 0,187 et 0,099 g de ClNa, respectivement pour PF-68, PEG 6000 et PVP 11000, en ce qui concerne l'action sur le volume.

Vis à vis du point d'hémolyse H50, les mêmes polymères, considérés au niveau 5 p. 100 remplacent environ 0,34, 0,315 et 0,095 de ClNa, respectivement pour PF-68, PEG et PVP. Les rapports d'action dans ces conditions sont donc : $\frac{0,34}{0,090} \approx 3,8$; $\frac{0,315}{0,187} \approx 1,7$ et $\frac{0,095}{0,099} \approx 0,96$, respectivement. L'action

observée est donc parfois plus forte vis-à-vis de l'hémolyse que vis-à-vis de la variation de volume. De plus, l'action observée vis-à-vis de l'hémolyse, rapportée à l'unité de concentration, croît avec cette dernière, ce qui fait que le rapport des deux effets (hémolyse/volume) n'est pas constant avec la concentration. On peut porter sur un graphique l'effet observé en "équivalent-ClNa", de l'unité de polymère en fonction de la concentration en polymère pour le point H50, pour le volume, pour le Δ cryoscopique (d'après les mesures en solutions pures) et pour l'effet attendu d'après les poids moléculaires estimés (en prenant 7500 pour PF-68, 5000 pour PEG et 7000 pour PVP). Nous l'avons ensuite simplifié.

Un tel graphique (figure 16) est difficile à interpréter, compte tenu des nombreuses approximations qui ont contribué à sa réalisation. Il semble toutefois qu'on puisse en gros en conclure que :

- 1 — L'effet sur le volume est de l'ordre de grandeur attendu pour un phénomène osmotique avec substance non pénétrante, compte tenu des imprécisions dans le poids moléculaire et des irrégularités déjà signalées dans le comportement cryométrique.
2. — L'effet sur l'hémolyse est nettement plus fort que l'effet osmotique attendu dans le cas de PF-68 et de PEG 6000 ; il est du même ordre pour la PVP 11000. Une action membranaire directe est donc très probable dans le cas des deux premiers polymères.

Dans le cas des hématies de Rat (étudiées seulement pour PF-68), la fonction qui relie le volume à la concentration de ClNa a une pente trop faible pour permettre une estimation précise de l'effet. Cependant, si on tient compte du fait que :

- 1/ la droite $V/V_0 = k (1/C)$ en ClNa a une pente moins forte que chez l'Homme,
 - 2/ la droite $V/V_0 = k C$ en PF-68 a une pente plus forte que chez l'Homme,
- on peut conclure que PF-68 modifie davantage le volume des hématies de Rat que des hématies humaines, et que la différence entre son action sur le volume et son action sur l'hémolyse 50 p. 100 est moins nette qu'avec les hématies humaines. L'action membranaire est donc vraisemblablement plus faible chez le Rat que chez l'Homme.

IV.— HEMOLYSE EN PRESENCE DE SAPONINE

A) Technique : Suspension au 1/200 de sang de Rat ou d'Homme dans des solutions à 5 p. 100 de polymères dans du sérum physiologique. Mélange de 4 ml de suspension d'hématies avec 1 ml de solution de saponine (Merck. Erg.B6) ($0,5$ à $2 \cdot 10^{-4}$ dans ClNa isotonique). Bain-marie 30 min. à 37° C. Centrifugation, lecture à 546 nm. Témoin d'hémolyse totale dans l'eau distillée + saponine $2 \cdot 10^{-4}$.

B) Résultats :

- 1.— PEG 6000 : Les concentrations finales réalisées dans le bain d'incuba-

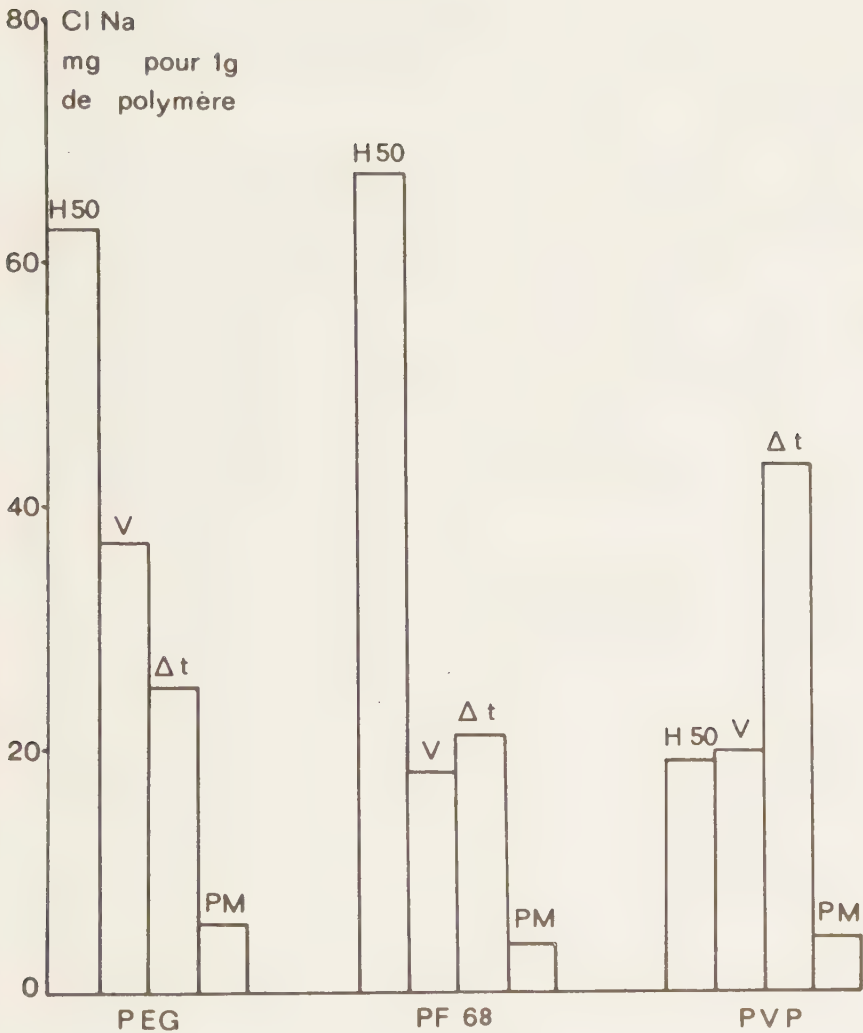


FIGURE I6: Schéma comparatif des effets des polymères sur le volume et la résistance osmotique des hématies. En ordonnées, on a porté la dose de chlorure de sodium (mg) remplacée par 1g de polymère dans diverses conditions (on s'est basé pour le calcul sur une équivalence entre 9 g/l de ClNa et $-0,56^{\circ}\text{C}$ de Δt , et on a supposé une dissociation complète de ClNa). Colonne H 50: action sur l'hémolyse (au niveau 5% de polymère). Colonne V: action moyenne sur le volume. Colonne Δt : calcul d'après l'abaissement cryoscopique en solution aqueuse à 5% de polymère. Colonne PM: calcul d'après les poids moléculaires moyens estimés (5000 pour PEG, 7500 pour PF 68, 7000 pour PVP. Il semble vraisemblable que la PVP est très polydispersée).

tion sont : 4 p. 100 de PEG et 10^{-5} à 4.10^{-5} de saponine. Dans ces conditions on observe avec les hématies de Rat, en l'absence de PEG, une hémolyse nulle pour 10^{-5} g/ml de saponine, proche de 50 p. 100 pour $2 \cdot 10^{-5}$ et totale pour 4.10^{-5} de saponine (tableau XXXI). En présence de PEG, l'hémolyse est encore totale pour 4.10^{-5} de saponine ; elle est nettement réduite pour 2.10^{-5} : 11,5 p. 100 au lieu de 46,8 p. 100. On note donc avec ce produit une légère protection contre l'hémolyse à la saponine.

Ces résultats sont confirmés par les valeurs trouvées avec des hématies humaines (tableau XXXI). Dans nos conditions d'expérience il faut un peu plus de saponine pour hémolyser 50 p. 100 des hématies humaines que pour celles du Rat ; la pente de la courbe est également plus forte que chez le Rat, ce qui oblige à serrer davantage l'échelle des concentrations (hémolyse 7 p. 100 pour 2.10^{-5} g/ml, 89 p. 100 pour 3.10^{-5} , 97 p. 100 pour 4.10^{-5}). En présence de PEG, l'hémolyse est réduite de façon significative, mais faible (49 p. 100 au lieu de 89 p. 100 pour 3.10^{-5} de saponine).

2 PF-68. Dans les mêmes conditions que le PEG, le PF-68 se comporte de façon différente. Avec les hématies de Rat on n'observe pas de protection, la tendance étant à une fragilisation non significative. Avec les hématies humaines, on observe une sensibilisation nette à l'action de la saponine : 67 p.100 environ d'hémolyse contre 7 p. 100 pour la concentration de 2.10^{-5} . L'effet est significatif, mais de faible intensité : à la concentration 1.10^{-5} de saponine, il n'y a plus d'effet visible.

3 PVP 1100. La PVP montre une action de même type que celle du PEG : protection légère mais significative contre l'hémolyse à la saponine. L'action est retrouvée aussi bien avec les hématies humaines qu'avec celles du Rat (tableau XXXI). Elle est un peu plus forte que l'effet observé avec le PEG.

TABLEAU XXXI

Hémolyse par la saponine in vitro, en présence des polymères. Chaque chiffre représente la moyenne de 10 à 40 mesures (pourcentage de l'hémolyse totale).

	Saponine dans le milieu (g/ml)	Témoins	PEG 4 p. 100	PF-68 4 p. 100	PVP 4 p. 100
Hématies du Rat	0	3,4	0,2	0,8	0,2
	10^{-5}	3,2	0,1	1,7	0,5
	2.10^{-5}	46,8	11,5	49,0	3,0
	4.10^{-5}	103,3	102,8	104,2	100
Hématies humaines	0	0,1	0	3,0	0,9
	2.10^{-5}	7,3	7,6	67,1	5,8
	3.10^{-5}	88,9	49,2	98,5	24,9
	4.10^{-5}	97,0	99,3	99,5	76,7

V. — HEMOLYSE EN PRESENCE DE LYSOCITHINE

Les venins de serpents contiennent une enzyme (découverte par DELEZENNE, et nommée depuis phospholipase A), qui détache une molécule d'acide gras des lecithines du jaune d'oeuf. On obtient ainsi une lysocithine, à propriétés hémolytiques. La lysocithine étant instable et difficile à manipuler, il faut la préparer extemporanément.

A) Technique :

Nous avons employé la méthode décrite par BOQUET et Coll. (1967), adaptée aux hématies humaines et au domaine de concentrations convenable. La lysocithine est formée in vitro pendant 1 h à 37° C en mettant en présence 0,5 ml de suspension de L α lecithine d'oeuf (Sigma) préparée en présence de Tween 20 selon BOQUET, et 1 ml de dilution de venin purifié de Naja Naja dans un tampon phosphate M/15 pH 7 (10^{-2} à 10^{-6} mg/ml). Après l'incubation on refroidit à 4° C et on ajoute : 1 ml de solution de polymère à 10 p. 100 dans Cl Na 9 p. 1000, puis 1 ml de sang humain dilué au 1/20 en ClNa isotonique. Après 30 min. d'incubation à 4° C, on centrifuge, dilue au 1/3 le surnageant, et lit à 546 nm. Des témoins des réactifs et d'hémolyse totale sont conduits parallèlement.

B) Résultats :

Dans ces conditions, l'échantillon de venin purifié utilisé forme une quantité de lysocithine donnant une hémolyse importante mais non totale, pour une concentration de 10^{-3} à 10^{-4} mg/ml.

Il nous a fallu pour sensibiliser la méthode réduire le domaine de concentrations exploré en étudiant des doses intermédiaires entre 10^{-3} et 10^{-4} mg/ml. Nous avons fractionné cet intervalle en utilisant les doses 10^{-3} , $6 \cdot 10^{-4}$, $3 \cdot 10^{-4}$ et 10^{-4} mg/ml. Il convient de noter que l'on arrive ainsi dans des zones où la méthode est à la limite de ses possibilités de précision. Les résultats rassemblés dans le tableau XXXII indiquent cependant autour de la zone d'hémolyse 50 p.100 (région la plus sensible) que PEG 6000 et PF-68 donnent une très légère protection contre l'hémolyse par lysocithine. Avec 10^{-4} mg/ml de venin, on a 39 p.100 d'hémolyse chez les témoins, et respectivement 22 et 29 p. 100 avec PEG et PF-68. Avec $3 \cdot 10^{-4}$ mg/ml de venin, l'hémolyse est de 46 p. 100 chez les témoins et respectivement 32 et 36 p. 100 avec PEG et PF-68. Ces différences sont significatives, mais très faibles, et ne représentent donc pas une action forte des polymères.

TABLEAU XXXII

Action des polymères sur l'hémolyse à la lysocithine (hémolyse en pour cent de l'hémolyse totale ; moyennes sur 20 mesures environ).

Hémolyse par 1 ml de venin de Naja Naja à la concentration de (mg/ml)	Témoins Na Cl	Polymères (concentration finale 3 p.100)	
		PEG 6000	PF-68
10^{-4}	39,1	22,1	28,7
$3 \cdot 10^{-4}$	46,1	32,4	36,0
$6 \cdot 10^{-4}$	62,5	56,7	56,5
10^{-3}	93,7	100	95,1

VI.— TENTATIVES DE PROTECTION CONTRE LA CONGELATION.

La constatation d'une protection partielle contre l'hémolyse osmotique avec PEG 6000 et PF-68 nous a conduit à essayer ce dernier produit comme substance protectrice de la congélation vis-à-vis des érythrocytes humains.

A) Technique :

La congélation a été obtenue sur des volumes de l'ordre de 2 à 4 ml, dans des flacons de verre, type "antibiotique", de 20 ml environ, immergés grâce à une tige de fixation rotative dans un bain d'alcool maintenu aux alentours de -75°C par de la carboglace. Le liquide, maintenu en couche mince sur les parois du flacon par la rotation, est congelé en un temps de l'ordre de 2 à 4 secondes. La décongélation est obtenue en plongeant le flacon dans un bain-marie à 37°C .

B) Résultats :

Le mélange de 2 ml sang + 0,5 ml PF-68 à 15 p. 100 donne une hémolyse forte mais non totale. Avec 2 ml sang + 2 ml PF-68 à 15 p. 100 l'hémolyse est légère seulement après congélation, mais les globules sont difficiles à resuspendre. En mélangeant à parties égales du sang total avec PF-68 à 36 p. 100, l'hémolyse est nulle après congélation-décongélation, le surnageant est parfaitement limpide, mais les globules sont irrécupérables : ils s'hémo lysent dès que l'on cherche à les laver d'une manière ou d'une autre. Il semble s'agir d'avantage d'une sorte de défécation de toutes les protéines et structures globulaires que d'une véritable protection.

Différentes associations ont été essayées pour tenter d'obtenir une meilleure récupération des globules : PF-68 20 p.100 + glucose 25 p.1000 ; PF-68 15 p. 100 + glucose 50 p. 1000 ; PF-68 35 p. 100 + sorbitol 120 p. 1000 ; PF-68 20 p. 100 + CINa 9 p. 1000 ; lavage des hématies au CINa 9 p. 1000, au glucose 100 p. 1000 ; aucun de ces procédés n'a permis d'améliorer sensiblement les résultats. Nous avons alors pris connaissance des travaux de TALBOT et GLAUSER (1955), GLAUSER et TALBOT (1956), qui avaient déjà tenté d'employer ces produits sans succès, et nous avons cessé d'expérimenter dans ce domaine.

VII.— ACTION SUR LES RECEPTEURS MUCOPROTEIQUES DE LA MEMBRANE.

WALTER et COYLE (1968) ont montré que le traitement des hématies humaines par la neuramidase modifie leur comportement dans un mélange Dextran-PEG (voir plus loin). Nous avons recherché si une interaction pouvait être mise en évidence entre nos polymères et les récepteurs mucoprotéiques responsables de l'héماغglutination par les myxovirus. Nous avons utilisé le PF-68 et le virus grippal de souche Pr.8. Des hématies de groupe O, prélevées sur mélange de Wintrobe ont été lavées trois fois au soluté de CINa à 9 p. 1000, puis suspendues à raison de 0,5 p. 100 dans ce soluté. Pour la réaction on utilise, en tubes, 0,5 ml de suspension de globules et 0,5 ml de dilutions de liquide allantoïque contenant le virus. Les dilutions de virus sont préparées dans CINa à 9 p. 1000 pour le titrage témoin, et dans un mélange PF-68 5 p. 100 + CINa 9 p. 1000 (ou PF-68 1 p. 100 + CINa 9 p. 1000) pour les réactions. On vérifie que les solutions de polymère ne donnent pas d'héماغglutination à elles seules.

Dans ces conditions, l'héماغglutination est identique en présence ou en l'absence de polymère. On en conclut :

- a) que le polymère ne se fixe pas sur les récepteurs des hématies en empêchant leur disponibilité pour le virus,
- b) que le polymère ne se comporte pas comme un inhibiteur non spécifique susceptible de fixer l'héماغglutinine du virus,

VIII.— DISCUSSION

a) Action hémolytique des surfactifs

HOOGHWINKEL et Coll. (1965) ont étudié *in vitro* l'hémolyse produite par un certain nombre de bromures d'alcoyl triméthylammonium. Les chaînes alcoyl utilisées étaient à 10, 12, 14 et 16 carbones. L'hémolyse mesurée au bout de 1, 3 et 18 heures d'incubation à 37° C donne une courbe de forme sigmoïde lorsqu'on exprime le pourcentage d'hémolyse en fonction du logarithme de la concentration moléculaire du détergent. L'effet hémolytique est beaucoup moins prononcé pour les molécules courtes que pour les détergents à longue chaîne. Les hématies de Mouton, de Vache et d'Homme se comportent de manière semblable vis-à-vis de ces détergents.

Les résultats de ces auteurs conduisent à conclure que, par suite de la présence de charges ioniques sur la membrane des érythrocytes, un certain nombre de molécules de surfactif s'accumulent sur cette surface chargée. L'accumulation est suivie par une association des molécules de détergent aux lipides de la membrane, due aux forces de Van der Waals entre les chaînes alcoyle du détergent et les molécules de phospholipides, ce qui entraîne un réarrangement structural des lipides. Pour que cette transformation de phase soit possible, il faut que le surfactif soit présent en surface de la membrane globulaire en quantité au moins équimoléculaire par rapport aux phospholipides et au cholestérol de la membrane. Le complexe lipides-détergent ainsi formé a des propriétés différentes de la membrane originelle, et il peut-être soluble dans le milieu environnant, avec lyse globulaire résultante. Il est à noter que les quantités moléculaires de lysolécitine et de saponine nécessaires pour produire l'hémolyse sont environ moitié moindres que la quantité équimoléculaire de phospholipides présente dans la membrane du globule rouge.

KONDO et TOMIZAWA (1968 a) ont étudié la libération des lipides de la membrane érythrocytaire sous l'influence d'agents tensio-actifs. Ils ont montré que les détergents cationiques ayant une chaîne alcoylée plus courte que 8 carbones possèdent une activité hémolytique, tandis que les membres correspondants de la série anionique n'ont aucune activité. Une plus grande quantité de phospholipides est libérée par les cations que par les anions (étude par chromatographie en couches minces).

Les agents tensio-actifs non ioniques ne produisent pas dans ces conditions de libération appréciable de phospholipides avant la lyse. Les agents tensio-actifs non ioniques utilisés étaient des éthers monododécyloxy du polyoxyéthylène-glycol (KONDO et TOMIZAWA, 1968 b). Les molécules de détergent sont adsorbées sur la membrane globulaire, et la quantité nécessaire à la production de la lyse diminue lorsque la longueur de la chaîne polyox diminue. Les non ioniques à chaînes polyox courtes sont donc plus efficaces.

Il est à noter que l'élévation de la température donne, alors que la quantité adsorbée est plus faible, une hémolyse complète. Le lieu d'attaque des molécules non ioniques polyoxyéthylées est vraisemblablement la portion cholestérol de la membrane globulaire.

Dans nos conditions, il est vraisemblable que PEG et surtout PF-68 se fixent sur la membrane ou près d'elle, puisqu'on observe des modifications de la résistance de la membrane. Par contre, nous n'observons jamais d'hémolyse. Ces faits semblent compatibles avec l'interprétation d'une modification de la structure de l'eau dans l'entourage immédiat de la membrane, aboutissant à une stabilisation de cette zone. Une liaison du PEG et de certains constituants de la membrane (lipides en particulier) est suggérée par certaines expériences de MAC VICKAR (1949). Cet auteur a étudié l'action hémolytique du complément en présence de PEG 4000. Dans un système hémolytique donné, il ne faut que la moi-

tié environ de la quantité habituelle de complément pour obtenir 50 p. 100 de lyse, si on opère en présence de 4 p. 100 de PEG 4000. L'auteur n'explique pas le phénomène, mais émet l'hypothèse d'une liaison du PEG avec les lipides membranaires.

b) Action d'autres polymères sur la charge et la surface des hématies.

CASTANEDA, BERNSTEIN et DARCO (1965) ont montré que le Dextran de faible poids moléculaire (40.000) augmente l'électro-négativité des globules rouges, mesurée par micro-électrophorèse. Cette augmentation d'électronégativité est associée à une diminution marquée, ou à une absence de l'agrégation des globules rouges. Les Dextrans de poids moléculaire moyen (80.000 à 150.000) augmentent également la charge négative des globules rouges du Chien, mais ils induisent l'agglutination des globules. A un moindre degré, le mannitol augmente aussi l'électronégativité des globules rouges et devrait donc avoir tendance à empêcher l'agrégation. La PVP, à des concentrations aussi basses que 1,5 p. 100, convertit le globule rouge normal électro-négatif en une particule électro-positif. Ce phénomène est sans doute en grande partie responsable de la production in vitro d'agré-gats par la PVP.

WALTER, KROB et GARZA (1968), ont étudié la répartition des globules rouges dans des systèmes aqueux biphasiques contenant du Dextran et du poly-éthylène-glycol. En effet, quand des solutions aqueuses de différents polymères sont mélangées, elles forment souvent des systèmes à deux phases. De tels systèmes peuvent être tamponnés, rendus isotoniques, et utilisés pour la séparation et la distribution à contre-courant de cellules, de particules cellulaires et de macromolécules (voir ALBERTSSON, 1960). En combinant la distribution à contre-courant d'érythrocytes normaux avec des techniques de marquage isotopique, WALTER et Coll., ont trouvé que les hématies de différents âges ont des répartitions différentes dans les deux phases. La charge de surface est vraisemblablement une des caractéristiques déterminantes principales et la diminution constante de la charge de surface durant la vie du globule rouge est peut être responsable de la séparation des érythrocytes de différents âges. Cette méthode, appliquée à du sang de rats traités par la phénylhydrazine permet de résoudre deux populations de réticulocytes ; les érythrocytes et les globules blancs peuvent être séparés dans un grand nombre d'espèces. Des différences dans l'état membranaire d'érythrocytes frais et conservés ont aussi été trouvées par cette méthode.

Il nous semble que la variation de forme des courbes d'hémolyse osmotique observée avec PF-68 et PEG 6000 pourrait être interprétée comme une discrimination dans l'âge des hématies. La charge de celles-ci, variant avec l'âge, pourrait conditionner une liaison plus ou moins forte avec les molécules de polymère ; selon la quantité de polymère formant l'environnement immédiat, les échanges d'eau et la résistance osmotique seraient variables, d'où un élargissement de la courbe de distribution des sensibilités individuelles à l'hémolyse osmotique.

Dans les systèmes bi-phasiques Dextran - PEG 6000, une augmentation de force ionique (à tonicité constante) ne semble pas altérer la séparation des érythrocytes, sauf avec le phosphate, pour lequel une diminution de séparation est observée. L'augmentation du pH ou de la température provoque une augmentation de la séparation. L'hypotonie donne des séparations semblables à celles que l'on observe en phase isotonique. L'hypertonie conduit à une rapide diminution des coefficients de séparation. Pour les globules humains, le groupe sanguin ne semble pas intervenir. Le lavage des cellules ou l'anticoagulant employé (A.C.D., héparine, E.D.T.A.) n'a pas d'effet sur la séparation. Il est à noter que la mobilité électrophorétique n'est pas toujours modifiée de façon exactement semblable à la séparation dans le milieu à deux phases. Dans certains cas, les deux méthodes semblent donc mesurer des caractéristiques membranaires différentes.

WALTER et COYLE (1968) ont traité les érythrocytes par différents enzymes pour étudier l'effet de ce traitement sur les phénomènes de séparation. L'acide sialique contribue d'une manière essentielle à la charge de la surface des globules rouges. Les auteurs ont donc essayé la neuraminidase et le traitement à la trypsine des globules rouges. Un tel traitement réduit de façon marquée la mobilité électrophorétique des érythrocytes et conduit à une diminution de séparation dans des systèmes aqueux à deux phases Dextran-PEG-6000. Par contre, le même traitement n'affecte pas la séparation dans un mélange Dextran-PEG 6000 contenant aussi le polymère cationique D.E.A.E. - Dextran.

Chez le Chat, ELIASSON et SAMELIUS-BROBERG (1963) ont trouvé que le Dextran de poids moléculaire 40.000 à 75.000 diminuait considérablement la stabilité du sang par augmentation de la vitesse de sédimentation. Par contre, en-dessous du PM 40.000, la vitesse de sédimentation n'est pas augmentée chez cet animal.

c) Interaction avec les protéines

FLETCHER, MARTIN et RATCLIFFE (1952) ont décrit une interaction de certains polymères avec le fibrinogène. Des Dextrans de viscosité intrinsèque 0,24 ; 0,31 ; 0,41 ; une préparation commerciale de PVP, de la laminarine hydrolysée à viscosité intrinsèque 0,2, de la gomme arabique, donnent un précipité in vitro avec des solutions de fibrinogène de 0,4 à 1,5 p. 100 dans du sérum physiologique à 9 p. 1000, lors d'un temps de contact de 16 heures à 4° C. La quantité de précipité augmente avec les concentrations croissantes de fibrinogène et des polymères. Lorsque le contact est effectué à 37° C, seule la laminarine forme un complexe insoluble à cette température. Le complexe Dextran-fibrinogène, isolé et préparé en grande quantité, a été injecté par voie intra-veineuse à la Souris, à la dose de 300 mg/kg. Aucune souris n'a présenté de réaction défavorable. Ces expériences évoquent une interprétation pour la faible toxicité in vivo de nos polymères. Bien que le PF-68 produise une précipitation in vitro des protéines plasmatiques, l'injection intra-veineuse de solutions concentrées est fort bien supportée par le Rat et le Lapin. La dénaturation obtenue est donc sans doute réversible.

d) Congélation

La conservation des érythrocytes par congélation est un problème qui préoccupe tous les centres de Transfusion du monde, et nous n'envisageons pas de discuter en détail ce problème, mais seulement de citer quelques travaux justifiant l'essai des polymères comme substance protectrice.

MAUPIN (1964), VALERI (1968), ont donné des revues des principales méthodes utilisées pour la conservation des érythrocytes par congélation.

En 1949, POLGE et Coll. rapportaient que les spermatozoïdes pouvaient être maintenus en survie après une période de congélation à - 79° C. lorsqu'on les congèle lentement et qu'on les réchauffe en présence de glycérol. A la suite de cette observation, de nombreux investigateurs ont rapporté des expériences réussies dans le domaine de la conservation des globules rouges humains. Actuellement, la congélation peut être effectuée rapidement (azote liquide) ou lentement par les moyens de réfrigération plus classiques, avec ou sans contrôle précis de la vitesse et de la température de congélation. Les additifs sont classés en deux catégories : additifs pénétrants, tels que le glycérol, le diméthylsulfoxyde, le glucose ; additifs non pénétrants tels que le Dextran, le lactose, la PVP et l'albumine. Avec le glycérol, il faut 40 à 50 p. 100 (p/v) de glycérol pour protéger les globules contre une congélation lente. Un grand volume (4 à 6 litres de solution de lavage) est nécessaire pour enlever le glycérol des cellules décongelées. Il faut environ une heure pour ce procédé. On peut utiliser des concentrations basses de glycérol (14 à 16 p. 100 p/v) en congelant dans l'azote liquide et en contrô-

lant la vitesse de congélation. Dans ces conditions on arrive à une perte *in vitro* d'hémoglobine cellulaire de 2 à 10 p. 100 seulement. Les cellules réchauffées sont lavées, soit par une technique de centrifugations successives, soit par une technique continue utilisant du sorbitol, du saccharose ou du mannitol dans la solution de lavage. Les cellules décongelées, marquées au chrome et réinjectées au donneur montrent une survie satisfaisante.

LOVELOCK (1953) a montré que lors de la congélation, les dommages survenant aux cellules proviennent principalement de la concentration des électrolytes à l'intérieur des cellules. En présence de glycérol, cette concentration au cours de la congélation est fortement réduite et le phénomène est suffisant pour expliquer l'action protectrice (1953 b). Il est à noter que l'action destructive de l'exposition à des solutions salines concentrées ainsi obtenues n'est pas absolument instantanée ; la survie des cellules rapidement congelées et décongelées est attribuée à ces facteurs de temps. La nature du dommage causé à la cellule par l'exposition à ces solutions salées concentrées est complexe. A concentration modérée, l'érythrocyte devient sensible à des chocs thermiques et mécaniques ; à des concentrations élevées, la structure cellulaire est dispersée. Le mécanisme des lésions a été discuté par André THOMAS (1963) dans un article général.

Le procédé de HUGGINS (1963), qui utilise le D.M.S.O., semble relativement dépourvu d'avenir étant donné la toxicité assez importante le plus souvent reconnue à ce produit à l'heure actuelle. HUGGINS est d'ailleurs actuellement revenu à l'emploi de glycérol. Sa solution contient également du glucose, du fructose et de l'E.D.T.A.

Il est à noter qu'en ce qui concerne la conservation par congélation de cultures de cellules de mammifères, JIRANEK (1966) a trouvé que le diméthylsulfoxyde donnait des résultats préférables au glycérol, à l'éthylène-glycol et au propylène-glycol, pour la survie de cultures de cellules humaines, de Hamster, de Rat et de Souris. L'étude de la morphologie, du temps de croissance et du caryotype n'a pas montré à cet auteur de différences entre les cellules ayant ou non subi la congélation.

BRICKA et BESSIS (1955) ont obtenu les premiers succès par congélation en présence de PVP et de Dextran. Ces auteurs utilisaient des érythrocytes humains séparés du plasma après prélèvement sur A.C.D. Un volume de culot globulaire était mélangé avec quatre volumes de PVP ou de Dextran à des concentrations de 25 à 40 p. 100. Dans ces conditions, le taux d'hémolyse était faible après congélation à -80°C . et réchauffement.

TALBOT et GLAUSER (1955) ont essayé de congeler les érythrocytes en présence d'autres agents non pénétrants. Ils ont utilisé des Pluronic, des Tétronic et des PEG. Ils trouvent alors que le PF-68 et que le Tétronic 707, dont les poids moléculaires sont de l'ordre de 7000 à 8000, sont efficaces dans la prévention de l'hémolyse due à la congélation aux alentours de -75°C . Ces deux composés, à la concentration de 25 p. 100 dans le sang total, protègent 94 p. 100 au moins des érythrocytes contre l'hémolyse. Les auteurs notent une diminution progressive de cette protection lorsque la concentration du composé est réduite. Les cellules survivantes semblent normales et montrent une fragilité osmotique normale dans une solution de chlorure de sodium à 0,6 p. 100. Cependant en 1956, les mêmes auteurs publient un article plus détaillé donnant de nouvelles observations sur ces phénomènes. En incubant des érythrocytes pendant une journée dans des solutions de polymères, GLAUSER et TALBOT montrent d'abord que ces polymères n'entrent pas dans la cellule, car la concentration du polymère dans le milieu de suspension reste constante après l'incubation. De plus, ces auteurs se rendent compte alors que si les érythrocytes traités par de hautes concentrations de polymères (25 p. 100 de PF-68 et de T-707), congelés et ré-

chauffés, sont étudiés du point de vue de leur fragilité osmotique, celle-ci est apparemment normale pendant les cinq premières minutes de la dilution dans le sérum physiologique. Cependant, quand la suspension est laissée au repos pendant une heure, les cellules s'hémo lysent complètement, aussi bien en ClNa 0,9 p. 100 qu'en Cl Na 0,6 p. 100. Ces constatations recourent parfaitement les nôtres, puisque nous n'avons jamais pu récupérer les cellules obtenues après congélation, bien que le surnageant soit apparemment exempt d'hémolyse.

GLAUSER et TALBOT se rendent compte aussi en 1956, que la concentration efficace du polymère est également une concentration dans laquelle une forte agglutination des érythrocytes se produit. En utilisant de la PVP à 25 p. 100 à la place du Pluronic, ces auteurs trouvent que l'hémolyse est complète au cours de la congélation. Ils remarquent que tous les composés qui ont été trouvés efficaces dans la prévention des lésions de congélation-décongélation possèdent des groupes polaires carbone-oxygène. Ces groupes sont capables de donner des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau, c'est-à-dire qu'une liaison peut être formée entre l'oxygène du polymère organique et l'hydrogène de l'eau. Il est donc possible que ces polymères modifient le réseau normal de la glace lorsque la congélation se produit.

Les PEG 6000 et 9000 à concentration de 20 p. 100 protégeaient également 95 p. 100 des globules humains de l'hémolyse au cours de la congélation-décongélation.

En 1962, SLOVITER et RAVDIN obtenaient un certain succès en utilisant pour la congélation une solution de PEG 500 (poids moléculaire moyen 635) à 20 p. cent (dilution finale) en présence de citrate de sodium. Après congélation, le lavage était fait avec une solution de saccharose à 10 p. 100. C'est principalement au cours du lavage que la perte de globules est importante. Si on utilise du chlorure de sodium au lieu de saccharose pour laver les cellules, la perte est encore plus forte.

D'après les données dont nous disposons actuellement, il ne semble pas que l'emploi de ces substances soit promis à un riche avenir dans ce domaine. La concentration nécessaire pour bloquer de façon suffisante les molécules d'eau apparaît en effet trop forte, et produit une déshydratation intracellulaire massive, tout au moins avec les molécules de PM voisin de 5000 à 8000.

e) Polymères et fixation cellulaire des virus

La PVP confère in vitro une certaine résistance aux cellules en culture, vis à vis de l'infection par le virus de l'herpès et celui de la vaccine (MICHAELS et Coll., 1966). Le pouvoir infectant in vivo du virus grippal A 2 vis-à-vis de l'oeuf embryonné n'est pas modifié par la PVP à 10 ou 20 p. 100 dans le liquide de Earle. Il semble donc que la PVP ne s'associe pas de façon irréversible. Par contre in vitro, 1 p. 100 de PVP conduit à une inhibition d'environ 50 p. 100 des plages formées par le virus de l'herpès et celui de la vaccine sur cellules KB et sur cellules d'embryon de poulet. Pour les cellules, 1 p. 100 de PVP semble supportable pendant des périodes prolongées, tandis que la concentration 10 p. 100 est tolérée 24 h., mais inhibe la croissance au bout de 2 à 3 jours.

MICHAELS et Coll., envisagent soit un effet de surface (déshydratation), soit un effet intracellulaire pour expliquer cette action. Au contraire, le diéthylaminodextran multiplie par 100 environ la sensibilité des cellules en culture primaire de rein de singe à l'infection par le RNA infectieux du poliovirus, et celle des cellules de rein de porc au RNA viral de la fièvre aphteuse (FAYET, 1967). Cet effet se manifeste lors de la dilution du RNA en PBS, et non s'il est dilué en liquide de Hanks + hydrolysate de lactalbumine. Le DEAE - D., qui est un polycation, modifierait peut-être la surface cellulaire : il pourrait agir sur les charges négatives du RNA et de la surface cellulaire.

CHAPITRE V

ACTION DES POLYMERES
SUR DES ORGANES ISOLESI.- MOTRICITE DU MUSCLE LISSE ISOLE.

L'action des polymères in vitro a été recherchée sur deux préparations classiques de muscle lisse intestinal, à motricité spontanée relativement élevée : le duodénum du Rat et le duodénum du Lapin.

A) Technique

La technique d'étude des contractions longitudinales du muscle lisse isolé selon les méthodes classiques in vitro ne mérite pas d'être exposée. Cependant, le système d'enregistrement isotonique adopté, qui utilise un capteur goniométrique, est original (ROZE, CHARIOT et JEUNEMAITRE, 1968), et nous le décrivons brièvement.

1.- Appareillage

a) Principe du capteur : Le goniomètre A.C.B. M 2300 (1) est un capteur à variation d'induction mutuelle. Un enroulement primaire, alimenté par une onde porteuse de fréquence 1000 Hz, est couplé avec deux enroulements secondaires par l'intermédiaire d'un noyau métallique mobile, solidaire d'un axe tournant. Lors de la rotation de cet axe, un déséquilibre apparaît entre les deux enroulements secondaires, sous forme d'une tension alternative qui, redressée et filtrée, constitue un signal proportionnel à l'angle de rotation de l'axe.

b) Principe de l'emploi comme myographe isotonique : La figure 17 indique comment un petit déplacement linéaire est transformé en mouvement de rotation. Une tige légère et rigide est fixée sur l'axe du capteur en son milieu C. Une force de traction s'exerçant en A (par exemple par un organe isolé dans son bain) est compensée par une force opposée en B (par exemple un poids de quelques grammes). On obtient ainsi un état d'équilibre. Un petit déplacement du point A (produit par la contraction de l'organe) entraîne la rotation de l'axe du capteur jusqu'à une deuxième position d'équilibre. Si le déplacement Aa est petit devant la distance AC, si Aa est sensiblement perpendiculaire à AC, on peut admettre que Aa vaut $\text{tg } \alpha$, et que $\text{tg } \alpha = \alpha$. Le signal fourni par le capteur, qui est proportionnel à α , est donc proportionnel au déplacement Aa. En déplaçant le point d'application de la force en A', A'', etc, on modifie la sensibilité du système en obtenant une rotation plus grande pour un même déplacement.

c) Eléments de technique : Le capteur M 2300, de plage de mesure $\pm 60^\circ$ (2), associé à son alimentation et démodulateur, donne un signal de mesure de $\pm 250 \mu\text{A}$ environ sur une charge de 1000Ω (soit $\pm 250 \text{ mV}$). Ce signal généreux permet d'attaquer directement un enregistreur potentiométrique ou à suiveur de spot pour les phénomènes lents. La figure 19 représente un tracé obtenu avec un enregistreur Philips PR 2200, échelle $\pm 250 \text{ mV}$, zéro central, avec

(1) A.C.B., 57 rue de Paris - 92 Bagneux.

(2) D'autres capteurs pourraient être utilisés pour des étendues de mesure différentes : $\pm 10^\circ$ (M 2310) ou $\pm 20^\circ$ (M 2320).

des fragments de duodénum de Lapin, sur lesquels on fait agir du PEG 6000 à 20 p. 100 en b, de la PVP 11000 à 10 p. 100 en a.

Le capteur est aisément fixé au dessus du bain marie. Une fois l'organe fixé en place, on règle la hauteur du capteur pour que la tige de commande soit horizontale, puis on positionne le zéro de la plage de mesure en tournant le boîtier du capteur.

Parmi les avantages du capteur, notons sa robustesse (non détérioration à des accélérations de ± 20 g entre 20 et 2000 Hz), et l'impossibilité de le détériorer par un trop fort déplacement : la rotation au-delà de la plage de mesure se traduit simplement par une non linéarité de la réponse électrique. La température est pratiquement sans effet sur les informations fournies (0,25 p. 100 de l'étendue de mesure pour 10^0 C), le frottement exercé par les paliers de montage de l'axe est négligeable (couple de frottement 5.10^{-5} m $\wedge$ N, soit 0,05 g avec un bras de levier de 10 cm), et la résolution est théoriquement infinie. On peut donc augmenter la sensibilité pour étaler par exemple seulement 10 p. 100 de l'étendue de mesure sur toute l'échelle de l'enregistreur, la limite n'étant imposée que par les caractéristiques de stabilité de la tension d'alimentation. Un graphique d'étalonnage est livré avec chaque capteur par le constructeur (fig. 18). Cet étalonnage peut être vérifié au laboratoire, en rotation ou en déplacement linéaire, à condition de disposer d'un système mécanique suffisamment précis pour réaliser des rotations de quelques degrés avec une précision de l'ordre de la minute d'arc, ce qui n'est généralement pas le cas des laboratoires de physiologie. Il n'y a en fait pas de raisons pour que l'étalonnage varie beaucoup, contrairement à un capteur de pressions par exemple, dans lequel des caractéristiques de membrane élastique sont en cause. De plus, nos mesures ont toujours été relatives et il importe peu que le déplacement réel de l'extrémité de l'organe soit de 3 ou de 3,1 mm par exemple, pourvu que la réponse soit linéaire dans la zone de déplacement, ce qui est à coup sûr le cas si on ne dépasse pas la zone de lecture de $\pm 250 \mu$ A sur 1000 Ω .

Pour comparer le système à d'autres appareils classiques comme les jauges de contrainte ou les capteurs de déplacements linéaires, indiquons simplement que les jauges de contrainte ne font que reproduire les tensions obtenues dans un matériau élastique, et que leur zone de linéarité correspond à une faible déformation, ce qui implique d'une part que la réponse obtenue dépend essentiellement des caractéristiques mécaniques du support sur lequel sont collées les jauges (problème important dans le cas des organes isolés), et d'autre part que leurs caractéristiques les indiquent plutôt pour des mesures isométriques, ou proches de l'isométrie. Enfin, l'électronique doit être soignée (donc coûteuse), car les jauges nécessitent des mesures de ΔR de l'ordre de quelques pour cent seulement. Pour ce qui est des capteurs de déplacements linéaires, le problème essentiel est celui de la force de rappel ; généralement assurée par un ressort, cette force n'est pas ou difficilement réglable, et des systèmes de démultiplication mécanique par bras de levier doivent être construits, ce qui complique l'instrument et introduit des frottements et des risques de non-linéarité. Ces systèmes, parfaitement valables pour d'autres applications, semblent moins pratiques que le goniomètre dans le cas des organes isolés à musculature lisse.

En outre, GONELLA (1967) a bien montré avec le duodénum de Lapin que l'étirement produit très vite une augmentation de l'activité électrique de l'organe. Il semble donc peu logique de travailler dans des conditions isométriques, où la moindre contraction se traduit par une forte augmentation de la tension mécanique, qui doit agir comme une auto-stimulation sur l'organe.

2.- Mode opératoire :

L'animal est assommé et saigné. Le duodénum prélevé est placé à 37° C dans du Tyrode aéré selon la formule :

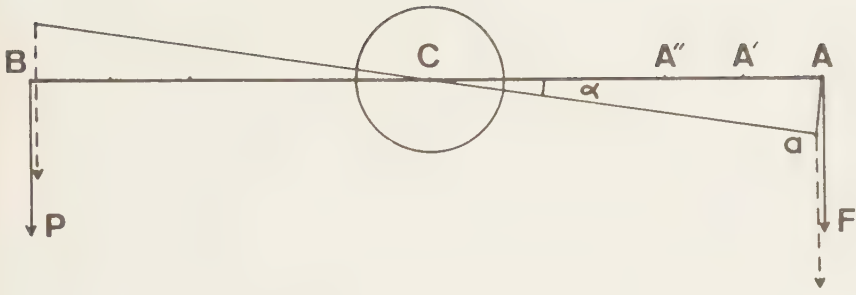


FIGURE I7: Principe de la transformation d'un déplacement linéaire en mouvement de rotation. La transformation n'est licite que si α est petit, et que F s'exerce de façon sensiblement perpendiculaire à AC.

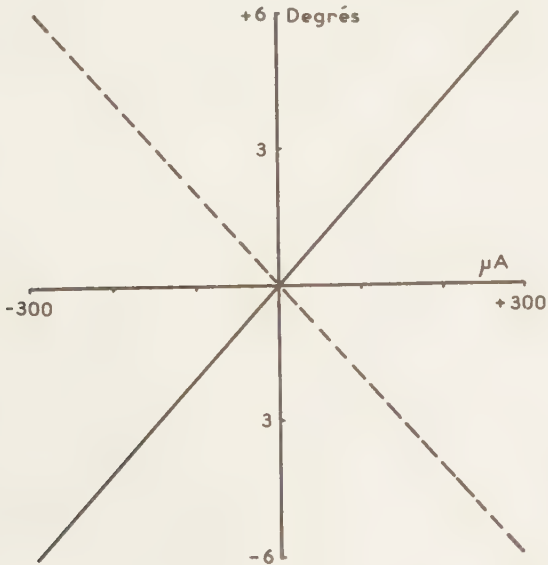


FIGURE I8: Exemple de courbe d'étalonnage en rotation. Capteur M 2300 N° 68, récepteur 1000 ohms. Pour des raisons de symétrie, le capteur possède deux plages de mesure à 180° l'une de l'autre. La plage positive (rotation positive, intensité positive) est représentée en trait plein; la plage négative (rotation positive, intensité négative) en trait interrompu.

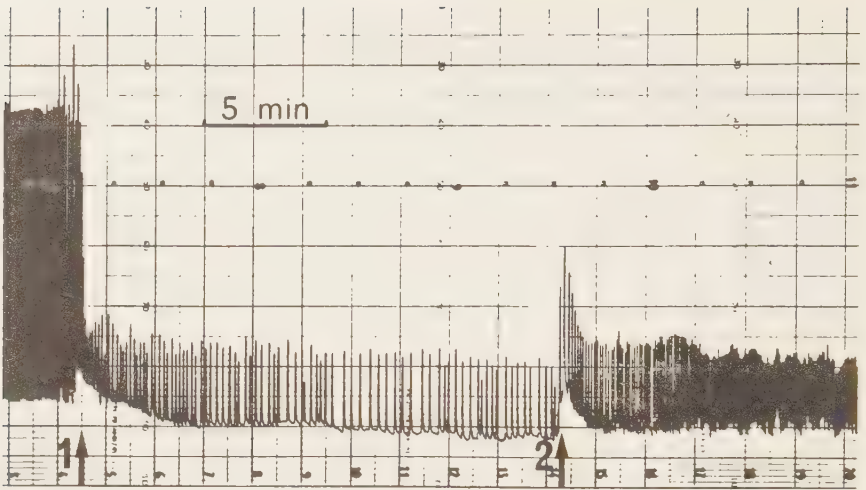


FIGURE I9a: Action de la PVP à 10% sur les mouvements spontanés du duodénum de Lapin. En 1: PVP; en 2: lavage. On note une diminution immédiate d'amplitude, et progressive de fréquence; la récupération est immédiate pour la fréquence, plus tardive pour l'amplitude. Tyrode, 37°C, charge 5g.

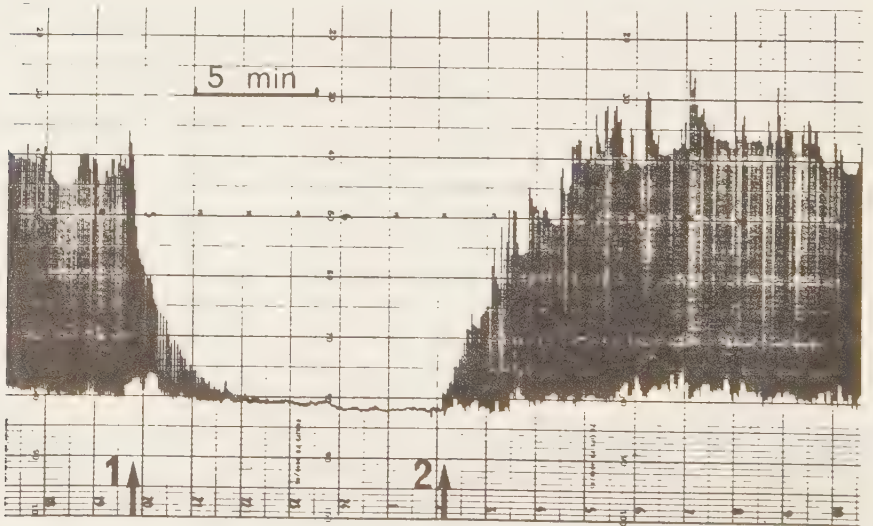


FIGURE I9b: Action du PEG à 20% sur les mouvements spontanés du duodénum de Lapin. En 1: PEG; en 2: lavage. La suppression des mouvements, de même que la récupération, sont progressives, mais rapides. Ce type d'action est analogue à un effet d'hypertonie ionique.

ClNa 8 g, ClK 0,2 g, Cl₂ Ca . 6 OH₂ 0,2 g, Cl₂ Mg . 6 OH₂ 0,01 g, PO₄ H₂ Na 0,50 g, CO₃ H Na 1 g, glucose 1 g, OH₂ q.s.p. 1 l.

Les solutions de polymères sont préparées à 5, 10 et 20 p. 100 dans le Tyrode. Deux types d'expériences sont effectuées :

- Action sur les mouvements spontanés,
- Action sur les contractions provoquées par deux spasmogènes du muscle lisse : acétylcholine et chlorure de baryum.

Dans le premier cas, on enregistre les mouvements spontanés pendant une période suffisante, puis on remplace complètement le bain par une des solutions de polymère dans le Tyrode préchauffé à 37° C. On laisse agir 2 à 5 minutes. On rince au Tyrode et on étudie la récupération. Dans le deuxième cas, on fait agir une dose déterminée d'agent contracturant en Tyrode normal. On rince, puis remplace le bain par du Tyrode contenant le polymère. Deux minutes plus tard, la même dose de l'agent contracturant est essayée ; on laisse agir 2 minutes. On rince et on étudie éventuellement la réponse à la même dose après récupération.

Les résultats sont exprimés en valeur relative par rapport aux valeurs de base prises comme unité. On aura ainsi l'amplitude relative des mouvements spontanés en présence de polymères, par rapport à l'amplitude mesurée en Tyrode immédiatement avant, et l'amplitude relative de la contraction par agent spasmogène, par rapport à l'amplitude observée avec la même dose, en l'absence du polymère.

TABLEAU XXXIII

Action des polymères sur les mouvements spontanés du duodénum du Rat Successivement, dans chaque case : moyenne, (expression en valeur relative par rapport à l'amplitude de base prise comme unité) nombre, variance, seuil de confiance de la différence à la valeur théorique 1.

Concentration p. 100	PF-68	PEG 6000	PVP 11.000
5	11 ; 0,44 0,0769 0,001	12 ; 0,75 0,0362 0,001	12 ; 0,49 0,0756 0,001
10	9 ; 0,26 0,6228 0,001	15 ; 0,03 0,0038 < 0,001	10 ; 0,14 0,0605 < 0,001
20	—	10 ; 0 < 0,001	9 ; 0 < 0,001

B) Résultats ; duodénum du Rat

1.— Action sur les mouvements spontanés :

Les résultats sont résumés dans le tableau XXXIII.

a) PF-68 : A la concentration de 5 p. 100, l'amplitude moyenne des mouvements spontanés est de 44 p. 100 de l'amplitude en Tyrode, pendant l'action du polymère. La récupération des mouvements est généralement bonne (0 à 5 minutes) ; elle est complète en 10 minutes, sauf dans un cas où la suppression de l'activité spontanée a été complète à la suite du traitement par le polymère. Le Tyrode utilisé est relativement pauvre en magnésium ; on a essayé de le renforcer en magnésium pour voir si une complexation de cet ion était en cause. L'addition au bain de 0,5 ml d'une solution de chlorure de magnésium à 4 p. 1000 pendant l'action du PF-68, ne rétablit pas la motricité normale. La complexation du magnésium n'est donc pas en cause.

Avec 10 p. 100 de PF-68, l'amplitude moyenne pendant l'action du polymère est de 26 p. 100 de l'amplitude spontanée. La récupération de la motricité spontanée de l'organe est généralement lente et mauvaise. Etant donné l'effet très net observé avec cette dose de polymère, la concentration de 20 p. 100 jugée trop toxique n'a pas été essayée.

b) PEG 6.000 : A la concentration de 5 p. 100 dans le Tyrode, l'amplitude des mouvements spontanés est de 75 p. 100 de la valeur de base en moyenne ; la récupération est rapide et bonne, avec parfois quelques irrégularités dans le décours de la succession des contractions.

Avec 10 p. 100, la motricité est pratiquement complètement supprimée. Dans 11 cas sur 15 organes, la motricité spontanée est nulle ; dans 4 cas elle est légère, ce qui conduit à une moyenne de 3 p. 100 de l'amplitude de base. Pendant l'action du produit, on note en plus une diminution progressive du tonus de l'organe, parfois accompagnée de quelques rares ébauches de contractions, dont chacune est suivie d'une décontraction telle que la longueur de l'organe augmente progressivement par rapport au niveau de départ (Rappelons que la méthode d'enregistrement est isotonique). La récupération est sensiblement immédiate dans tous les cas, dès le rinçage au Tyrode, avec parfois un bref passage d'hyperactivité.

Etant donné la bonne tolérance de la solution à 10 p. 100, la solution à 20 p. cent a été essayée : dans 10 cas sur 10, on note une suppression totale de l'activité motrice, avec le plus souvent une diminution du tonus de base de l'organe. La récupération est immédiate avec une légère hyperactivité dans 3 cas ; elle est presque immédiate dans 3 cas ; mauvaise au départ, puis lentement progressive dans 4 cas.

c) PVP 11.000 : A la concentration de 5 p. 100, la valeur moyenne de l'amplitude est 49 p. 100 de la valeur de base. Parfois l'addition de la PVP provoque une légère contraction de l'organe, ensuite suivie de la diminution de la motricité spontanée. La récupération des mouvements après rinçage au liquide de Tyrode est rapide et bonne.

Avec 10 p. 100, l'amplitude moyenne est de 14 p. 100 de la valeur de base ; la récupération de la motricité est immédiate dès le lavage, avec parfois une phase de légère hyperactivité ; on note ensuite assez souvent des irrégularités dans la fréquence des contractions. Ce type d'irrégularités peut faire évoquer des anomalies dans la genèse des ondes électriques lentes qui provoquent la contraction de l'organe.

Avec 20 p. 100, la motricité est dans tous les cas (9 sur 9) totalement supprimée. La récupération est immédiate, mais laisse ensuite parfois percevoir quelques irrégularités de fréquence et d'amplitude des mouvements spontanés.

2.- Action sur les contractions provoquées par l'acétylcholine et le chlorure de Baryum (Tableau XXXIV).

a) PF-68 :

—Acétylcholine : Une dose d'acétylcholine donnant une contraction sous-maximale est administrée avant, pendant et après l'addition du polymère à l'organe. Cette dose est de 2,5 à 5 microgrammes pour 20 ml de bain suivant les organes. Après action du PF-68 à 5 p. 100, la contraction provoquée par l'acétylcholine est de 12 p. 100 de sa valeur moyenne avant l'action du polymère. Cinq à dix minutes après rinçage du polymère au Tyrode la valeur moyenne de la contraction obtenue est de 20 p. 100 de la valeur précédente (Tableau XXXIV).

Avec 10 p. 100 de PF-68, on observe : 31 p. cent de la contraction de base lorsque l'acétylcholine est administrée en même temps que le polymère ; 13 p. 100 de la contraction de base lorsque l'acétylcholine est administrée 5 à 10 minutes après le lavage du polymère. On observe donc une diminution de l'effet de l'acétylcholine ; la récupération n'est pas immédiate.

—Chlorure de baryum : La dose de chlorure de baryum utilisée est de 0,25 à 1 milligramme pour un bain de 20 ml suivant les organes. Cette dose donne une contraction sous maximale. En présence de PF-68 à 5 p. 100, l'amplitude de la contraction passe à 14 p. 100 de la valeur mesurée avant le polymère ; 5 à 10 minutes après rinçage, la valeur moyenne obtenue par le chlorure de baryum est de 30 p. cent de sa valeur de base.

Avec le PF-68 à 10 p. 100, les valeurs suivantes sont obtenues : 22 p. 100 en moyenne pendant l'action du polymère ; 28 p. 100 en moyenne 5 à 10 minutes après le lavage du polymère.

b) PEG 6.000 :

—Acétylcholine. Avec une solution à 5 p. 100 de PEG dans le Tyrode, on trouve : 106 p. 100 de la contraction de base pendant l'action du polymère ; 97 p. 100 de la concentration de base 5 à 10 minutes après l'action du polymère. L'action de l'acétylcholine n'est donc pas modifiée par la solution de PEG à 5 p. 100. Avec la solution à 10 p. 100, on observe : 96 p. 100 de la contraction de base pendant l'action du polymère ; 89 p. 100 5 à 10 minutes après. Avec le PEG à 20 p. cent, on obtient : 25 p. 100 pendant l'action du polymère, 76 p. 100 5 à 10 minutes après.

Dans l'ensemble, le PEG modifie donc peu l'action de l'acétylcholine, sauf avec la forte dose de 20 p. 100 et ceci seulement lorsque le polymère est présent dans le bain. La récupération semble dans tous les cas bonne et rapide.

—Chlorure de baryum : En PEG à 5 p. 100, on observe les valeurs moyennes de 137 p. 100 pendant l'action du polymère, de 99 p. 100 après ; avec PEG à 10 p. 100, les valeurs sont de 105 p. 100 pendant l'action du polymère, de 85 p. 100 après ; avec le PEG à 20 p. 100 la valeur est de 5 p. 100 seulement pendant l'action du polymère, et de 60 p. 100, 5 à 10 minutes après.

L'effet du chlorure de baryum est donc peu modifié aux concentrations 5 et 10 pour cent du polymère ; on note même une légère augmentation de l'effet avec la dose de 5 p. 100. Avec la solution à 20 p. 100, la contraction musculaire est sensiblement supprimée en présence du polymère, mais la récupération est rapide et assez bonne.

c) PVP 11.000 :

—Acétylcholine : Avec la solution à 5 p. 100, la contraction est de 75 p. 100 de sa valeur de base en présence du polymère, et de 103 p. 100 de cette valeur 10 minutes après. Avec 10 p. 100 de PVP, la concentration vaut 56 p. 100 de sa valeur basale pendant l'action du polymère, et 91 p. 100, 10 minutes après. Avec la PVP à 20 p. 100, la contraction vaut 3 p. 100 de sa valeur de base en pré-

TABLEAU XXXIV

Action des polymères sur les contractions provoquées par l'acétylcholine et le chlorure de baryum. (Duodénum du Rat ; successivement dans chaque case : moyenne, nombre, variance, seuil de confiance de la différence à la moyenne théorique 1).

	Concentration p. 100	PF - 68		PEG 6.000		PVP 11.000	
		Pendant	10 min. après	Pendant	10 min. après	Pendant	10 min. après
ACÉTYLCHOLINE	5	0,12 12 ; 0,0052 0,001	0,20 7 ; 0,0168 0,001	1,06 8 ; 0,1044 NS	0,97 6 ; 0,1072 NS	0,75 10 ; 0,0629 0,02	1,03 7 ; 0,0244 NS
	10	0,31 5 ; 0,0218 0,001	0,13 4 ; 0,0017 0,001	0,96 11 ; 0,0935 NS	0,89 9 ; 0,0454 NS	0,56 10 ; 0,0673 0,001	0,91 9 ; 0,0387 NS
	20	—	—	0,25 10 ; 0,0553 0,001	0,76 7 ; 0,0213 0,01	0,03 7 ; 0,0014 0,001	0,94 6 ; 0,2045 NS
	5	0,14 13 ; 0,0037 0,001	0,30 9 ; 0,0314 0,001	1,37 11 ; 0,0661 0,001	0,99 9 ; 0,0175 NS	0,89 13 ; 0,1916 NS	0,96 11 ; 0,1572 NS
	10	0,22 8 ; 0,0190 0,001	0,28 6 ; 0,0773 0,01	1,05 11 ; 0,3938 NS	0,84 8 ; 0,0504 NS	0,34 12 ; 0,0372 0,001	0,99 7 ; 0,1025 NS
	20	—	—	0,05 9 ; 0,116 0,001	0,60 6 ; 0,0686 0,01	0,12 8 ; 0,0096 0,001	0,95 8 ; 0,2078 NS
CHLORURE DE BARYUM							

sence du polymère dans le bain, et 94 p. 100 de sa valeur de base 10 minutes après rinçage.

Pour la PVP, on constate que dans tous les cas, la récupération est excellente ; l'action est légère pour 5 p. 100, moyenne pour 10 p. 100, forte pour 20 p. 100 en présence de PVP.

— Chlorure de Baryum : Les valeurs moyennes sont de 89 p. 100 pendant et de 96 p. 100 après avec la solution à 5 p. 100. Avec 10 p. 100, les valeurs moyennes sont de 34 et 99 p. 100 respectivement ; avec la solution à 20 p. 100, les valeurs moyennes sont de 12 p. 100 pendant l'action du polymère, et de 95 p. 100, 5 à 10 minutes après (Tableau XXXIV).

Ces résultats sont donc sensiblement comparables à ceux qui sont observés au cours de la contraction par l'acétylcholine, l'action du polymère étant progressive entre 5 et 20 p. 100 ; dans tous les cas, la récupération est excellente et immédiate.

C) Résultats ; duodénum du Lapin.

La technique est la même que pour le duodénum du Rat (t^0 : 37^0 C, barbotage d'air) ; le liquide de Tyrode contient 0,10 g/l de Cl_2 Mg 60 H_2 . Quelques essais seulement ont été pratiqués, à titre de confirmation des données précédentes.

1.— Action sur les mouvements spontanés

La motricité spontanée est nettement diminuée par les polymères, complètement supprimée aux concentrations fortes.

a) PF-68 : Avec 10 p. 100 dans le bain, l'amplitude observée a une valeur moyenne de 0,24 (6 essais) en présence du polymère. La récupération après lavage est progressive mais satisfaisante (0,86 après 10 minutes, 1,01 après 20 minutes). Avec 20 p. 100, l'amplitude vaut 0,20 (3 essais) en présence du polymère ; la récupération après lavage est bonne, avec une légère augmentation d'amplitude (1,17 après 10 minutes de lavage). En même temps s'observe une diminution du tonus de l'organe et une petite diminution de fréquence des contractions. Le lavage produit souvent une nette augmentation du tonus en même temps que la réapparition des mouvements spontanés.

b) PEG 6000 : Avec 10 p. 100 dans le liquide de Tyrode, l'amplitude en présence du polymère vaut en moyenne 0,31 de sa valeur de base (6 essais). En même temps s'observe une petite diminution du tonus de l'organe ; la fréquence est peu modifiée. Le lavage amène une récupération immédiate, avec une phase d'hyperactivité (amplitude 1,31 après 10 minutes, 1,24 après 20 minutes).

A la concentration 20 p. 100, l'arrêt des contractions est complet en 2 à 3 minutes (amplitude moyenne 0,01 ; 4 essais), avec légère diminution du tonus. Le lavage amène une récupération immédiate (amplitude 1,01 après 10 minutes, 0,98 après 20 minutes). La fréquence n'est guère modifiée.

c) PVP 11.000 : Avec 10 p. 100, l'amplitude moyenne est de 0,34 (5 essais) en présence du polymère. On observe en même temps une importante chute de tonus, et une diminution de la fréquence des contractions, qui tombe à environ 50 p. 100 de sa valeur normale. Le lavage donne une augmentation du tonus et une reprise progressive des contractions (amplitude 0,37, 10 minutes après le lavage ; 0,61, 20 minutes après). Avec 20 p. 100 de PVP, l'arrêt des contractions est total (amplitude moyenne 0, 6 essais), et la reprise après lavage est lente et incomplète.

2.— Action sur les contractions à l'acétyl-choline.

Une contraction d'amplitude sous-maximale est provoquée par une dose convenable d'acétyl-choline (0,8 μ g en général). En présence des polymères, la même dose donne un effet plus faible : respectivement 0,70 ; 0,71 ; 0,10 pour les concentrations 10 p. 100 de PF-68, PEG 6000 et PVP 11.000. Pour 20 p.

100 de polymères, les spasmes sont totalement supprimés avec les trois corps (9 essais).

D) Discussion

SALACH et GERSHBEIN (1968) ont étudié l'action du polyéthylène-glycol sur la contraction du muscle lisse produite par la cholécystokinine et l'histamine. Ces auteurs concentrent des solutions renfermant de la cholecystokinine, par dialyse contre du PEG 20.000. Comme l'activité cholécystokinétique dialyse et se trouve en fin d'opération dans la solution de glycol, l'effet du PEG sur les contractions provoquées par la cécékine a été contrôlé. Les organes utilisés sont l'iléon terminal et la vésicule biliaire de cobaye, et la vésicule de Porc. Le PEG 20.000, d'origine UNION CARBIDE, est donné à la dose de 500 mg pour un bain de 50 ml. La vésicule biliaire du Porc répond au PEG de façon invariablement nulle ou très faible. Par contre, la réponse à la cholécystokinine en présence de PEG est diminuée de 30 à 40 p. 100. La réponse de la vésicule à l'histamine est aussi inhibée par le PEG, diminution allant parfois jusqu'à 75 p. 100. Des variations dans l'effet sont observées suivant que le PEG est ajouté avant ou après l'agent contracturant. Le PEG provoque régulièrement une relaxation variable de l'iléon terminal ; les relaxations les plus importantes sont obtenues sur les organes les plus contractés. En même temps les auteurs observent une tendance à la diminution de fréquence des contractions toniques, et à l'augmentation d'amplitude de ces contractions. Sur l'iléon terminal, la réponse à l'histamine est diminuée d'environ 60 p. cent par rapport à sa valeur normale.

SALACH et GERSHBEIN discutent le mécanisme d'action du PEG. Il est probable que l'effet du PEG est très général et s'applique à des espèces différentes du Cobaye. On peut d'abord envisager un effet osmotique, car le produit est un non-électrolyte de haut poids moléculaire qui vraisemblablement ne pénètre pas la cellule. Mais le domaine de concentrations exploré est de $2,5 \cdot 10^{-5}$ à $25 \cdot 10^{-5}$ en PEG, ce qui correspond au maximum à une pression osmotique calculée de 0,06 atmosphère, qui semble négligeable. La possibilité de certaines interactions spécifiques reste donc, soit entre PEG et tissu, vraisemblablement à la surface cellulaire, soit entre le PEG et l'histamine en solution, soit entre le PEG et certains systèmes enzymatiques, par exemple un de ceux qui mettent en oeuvre la diamine oxydase. Un argument en faveur d'un effet direct sur le tissu ressort dans cette série d'expériences d'une récupération seulement progressive de la contractilité à l'histamine après l'addition de PEG, comme si le PEG se fixait de quelque façon sur le muscle et était lavé ensuite avec difficulté. Cependant on ne trouve pas dans la littérature d'arguments en faveur de l'interaction du PEG avec un système catalytique ou une activité hydrolytique quelconque. Nos expériences sur les systèmes enzymatiques (chap. III) sont même contraires à cette possibilité. Pour obtenir un effet net, la présence de concentrations élevées de polymères est nécessaire. CAHEN et AUBRON (1959), avec 0,3 à 3,5 p. 100 de PF-68, n'avaient noté qu'une diminution de tonus, ou pas d'effet sur des fragments d'intestin de Lapin (38° C) et de Rat (34° C).

ROCHAT, GUILLOT, VERAINE, et DEBELMAS (1967) ont étudié l'activité antispasmodique *in vitro* de quelques surfactifs non ioniques. Parmi les produits essayés, nous retiendrons : l'oléate de polyoxyéthylène glycol 1540, dont le HLB (1) est voisin de 16 et dont la chaîne PEG renferme de 33 à 36 mo-

(1) Notion introduite par GRIFFIN (1949), qui caractérise la balance hydrophile-lipophile de la molécule.

lécules d'oxyde d'éthylène ; le stéarate 1540, stéarate de PEG 1540 dont le HLB est également voisin de 16, l'oxypol, enfin, octylphénol polyoxyéthyléné, renfermant 9 à 10 molécules d'oxyde d'éthylène.

Les résultats montrent que les surfactifs non ioniques utilisés à la concentration finale de 1/10.000 présentent tous des activités antispasmodiques nettes, et ceci pour tous les surfactifs essayés. Sur l'iléon de Cobaye, l'oxypol donne une inhibition de 80 à 100 p. 100 des contractions à l'acétylcholine, au baryum, et à l'histamine. L'oléate de PEG donne une inhibition forte des contractions à l'acétylcholine, moindre des contractions au baryum et faible des contractions à l'histamine. Le stéarate de PEG donne une inhibition forte des contractions à l'acétylcholine, moyenne (40 à 60 p. 100) des contractions au baryum et des contractions à l'histamine. Avec le duodénum de Rat, l'oxypol a une action très nette sur les contractions à l'acétylcholine et au baryum, l'oléate de PEG a une action nette sur les contractions à l'acétylcholine, mais non sur les contractions au baryum. Le stéarate de PEG a peu d'action sur l'acétylcholine et sur le baryum. Avec le jéjunum de Lapin, l'oxypol agit fortement sur les contractions à l'acétylcholine et au baryum, l'oléate et le stéarate de PEG agissent peu ou pas sur l'une et l'autre.

Les contractions adrénaliniques de l'aorte de Lapin sont peu modifiées par l'oxypol et pas du tout par oléate et stéarate de PEG.

ROCHAT et Coll. pensent qu'il existe un certain parallélisme entre les activités antispasmodiques trouvées et les différentes valeurs des tensions superficielles. Toutes les actions sont réversibles par simple lavage des organes avec du liquide de Tyrode. Cependant, les organes présentent souvent après l'application des substances tensio-actives une instabilité et une hypersensibilité vis-à-vis des spasmogènes employés, surtout en ce qui concerne les spasmes à l'histamine et à l'acétylcholine. L'action propre des surfactifs étudiés sur la musculature lisse est très discrète, mise à part une certaine chute de tonus accompagnée d'une diminution de l'amplitude des contractions spontanées du duodénum de Rat et du jéjunum de Lapin.

SAMS, CARROLL et CRANTZ (1966) ont étudié l'action du DMSO sur des préparations de muscle lisse et strié: diaphragme, estomac et oreillette isolée de Cobaye. Aux concentrations de 3 et 6 p. 100, le DMSO diminue significativement la réponse du diaphragme à la stimulation électrique directe et indirecte. La dépression musculaire paraît directe car il n'y a pas de blocage neuromusculaire. Des fasciculations spontanées sont observées régulièrement, et pourraient être dues à un effet anticholinestérase du DMSO, qui est prouvé *in vitro*. DMSO donne une augmentation du tonus du muscle lisse gastrique, n'a pas d'action sur le rythme de l'oreillette, et augmente l'amplitude de la contraction auriculaire à la concentration de 10 p. 100.

Une diminution nette du seuil d'action du vague nécessaire pour arrêter les contractions auriculaires est également constatée. Il peut s'agir soit d'une augmentation de la perméabilité sodium, soit d'une action anti-cholinestérase au niveau de la jonction nerf vague - muscle.

Enfin, du point de vue purement technique, il faut signaler que GONELLA (1967), dans une très bonne étude électrophysiologique de la motricité du duodénum de Lapin, conseille *in vitro* l'emploi d'un liquide de KREBS modifié selon BULBRING et CODE, aéré par un barbotage de carbogène à 7 p. 100 de CO₂ : ClNa 7,5 g, ClK 0,35 g, Cl₂ Ca. 20 H₂ 0,28, Cl₂ Mg. 60 H₂ 0,10 g, PO₄ H₂ Na 0,165 g, CO₃ H Na 1,37 g, glucose 1,4g, OH₂ q.s.p. 1 l. Les meilleurs résultats sont obtenus en perfusant avec du liquide physiologique l'appareil circulatoire de l'organe. Dans ces conditions la motricité duodénale est stable pendant 4 h. environ à 33 - 34° C, tandis que la stabilité ne dépasse

pas 2 h.30 à 3 h. à 38° C.

II.— ACTION SUR LA CONDUCTION DE L'INFLUX DANS LE NERF ISOLE

L'action des polymères sur le tissu excitable nerveux a été étudiée sur une préparation classique : le nerf sciatique isolé de grenouille.

A) Techniques.

La solution de conservation est un liquide de Ringer préparé selon la formule suivante et ajusté à pH 7,6 : ClNa 9 g, ClK 0,42 g, Cl₂ Ca 0,24 g, CO₃ HNa 0,50 g, glucose 1 g, eau distillée q.s.p. 1,4 l (in LAURENCE, 1964). Les polymères sont dissous dans le Ringer à raison de 10 et 25 g pour 100 ml de solution. Le pH est ensuite ajusté à 7,6 (important pour la PVP, qui donne des solutions nettement acides).

1.— Dissection du sciatique.

La grenouille est démédullée et décérébrée. La peau est enlevée par incision circulaire au niveau de la partie médiane du corps et arrachement vers l'extrémité des membres inférieurs. L'animal est fixé sur un liège en décubitus ventral ; dégagement de la région lombaire en soulevant le sacrum et mise en évidence de toutes les racines des sciatiques ; section transversale du sacrum. Nerf droit : ligature juste au-dessus de l'articulation tibio-fémorale, section et dégagement progressif vers le haut sans entraîner de vaisseaux et sans exercer de traction ; section des racines. Le nerf est rincé au Ringer, puis porté dans la solution étudiée, à la température du laboratoire. La même technique est appliquée au sciatique gauche. On dispose pour chaque animal d'un couple de nerfs dont l'un servira toujours de témoin (Ringer) et l'autre de traité (solution à étudier). Le nerf est porté dans la cuve en le manipulant à la pince par le fil de traction, qui est laissé très court pour éviter les artefacts. La stimulation est toujours effectuée sur le bout distal, et l'enregistrement sur le bout proximal du nerf.

2.— Matériel :

— Cuve : La cuve, de plexiglas, porte une série d'électrodes d'argent de 8/10 mm, éloignées l'une de l'autre de 6 mm environ et situées à 10 mm du fond ; elles ont un seul point de contact avec le plexiglas. Le nerf est posé en travers des électrodes et y reste en suspension. L'humidité assurée par une petite quantité de liquide de Ringer placée au fond de la cuve est suffisante pour assurer une parfaite conservation pendant les quelques minutes de chaque mesure. Entre les mesures, le nerf est transféré dans son liquide de conservation.

— Appareillage : Le stimulateur est un ST II C (1), fonctionnant en répétitif 20 Hz, impulsion de 40 μ s de largeur ; deux voies sont branchées sur la même sortie, ce qui permet la détermination des périodes réfractaires. L'oscilloscope est un Tektronix (2) 565 équipé d'un tiroir différentiel haute sensibilité 2 A 61 et d'un tiroir différentiel double 3 A 3. Les deux canaux sont actionnés par la même base de temps, déclenchée par la prise synchro du stimulateur. On présente en même temps sur l'écran à une échelle convenable le stimulus sur un canal et la réponse sur l'autre. Echelles généralement choisies : temps 0,2 ms/cm ; stimulus : 0,2 V/cm ; potentiel d'action : 2 mV/cm. Les branchements des entrées et de la masse sont schématisés sur la figure 20. Les réglages des tiroirs sont les suivants : pour le 3 A 3 qui reçoit le stimulus : entrée différentielle (AC-AC), bande passante large ; pour le 2 A 61 : bande passante 6 Hz - 100 KHz, entrée différentielle, filtre secteur 50 Hz. Les deux tiroirs sont commandés par la même base de temps, déclenchement externe, couplage AC rapide pente +. L'emploi d'une unité d'isolement n'a pas été trouvé nécessaire (la cuve est placée en cage de Faraday).

(1) Equipements Industriels, 1 rue Monticelli, Paris 14ème.

(2) R.T.I., 134 avenue Malakoff, Paris 16ème.

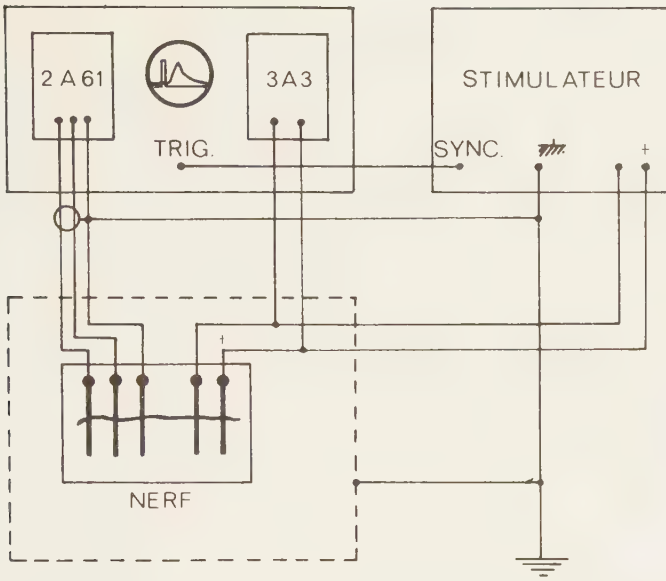


FIGURE 20: Schéma du montage utilisé pour les expériences sur nerf isolé.

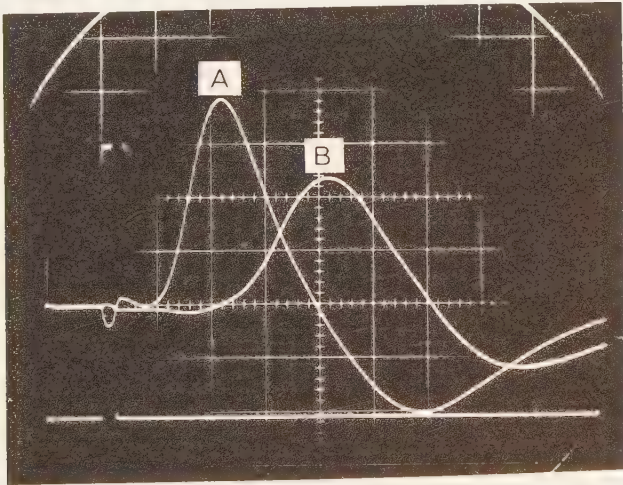


FIGURE 21: Exemple d'oscillogramme obtenu avec le montage de la figure 20, avec deux nerfs d'une même grenouille. En A: sciatique droit, témoin, 28h en Ringer; en B: sciatique gauche, traité, 28h en PVP 10%. Abscisses: 0,2 ms/cm; ordonnées: stimulus 0,2 V/cm, potentiel 2 mV/cm, (1 carreau = 1 cm). Double exposition; répétition des stimulations: 50 par seconde.

3.— Conditions des mesures :

Les mesures effectuées sur chaque nerf sont les suivantes :

1/ Avec des impulsions de 40 μ s de largeur, fréquence 20 Hz : seuil de stimulation, défini comme l'amplitude du stimulus nécessaire pour déclencher un potentiel visible ; optimum de stimulation, défini comme la tension minimale du stimulus donnant la plus grande amplitude de réponse ; amplitude de la réponse, mesurée à partir de la ligne de base comme l'amplitude du premier maximum ; vitesse de conduction, mesurée sur l'écran comme le temps écoulé entre le front de départ du stimulus et le maximum de la réponse, pour une certaine distance entre électrodes ; la vitesse en m/s peut être calculée à partir de cette distance ; période réfractaire absolue, définie comme le temps pendant lequel un deuxième stimulus ne donne aucune réponse, les deux stimulus étant de l'amplitude optimale définie précédemment ; période réfractaire relative, évaluée approximativement au temps après lequel un deuxième stimulus optimal donne une réponse d'amplitude égale ou supérieure à 95 pour 100 de la première réponse. Toutes les mesures sont effectuées sur l'écran de l'oscilloscope, en variant les vitesses de balayage pour obtenir sur chaque paramètre la meilleure estimation possible.

2/ Avec des impulsions de largeur variable, à fréquence 20 Hz, on a déterminé des courbes intensité-durée entre 20 et 500 μ s de durée d'impulsion, en mesurant la tension nécessaire pour obtenir une certaine amplitude de réponse, choisie sous-maximale, aux environs de 75 p. 100 de la réponse la plus ample. Pour établir ces courbes, les réglages du stimulateur ont été étalonnés en temps réels pour obtenir des impulsions de 20 à 500 μ s réelles, les temps étant mesurés avec la précision des bases de temps de l'oscilloscope ($\pm$ 5 p. 100), entre le début de la partie montante et le début de la phase descendante du stimulus. Cet étalonnage est nécessaire, car les indications portées sur les boutons du stimulateur ne correspondent qu'approximativement aux temps réels obtenus.

Dans un certain nombre de cas, des clichés ont été pris avec une chambre photographique à dos Polaroid (Tektronix C 27), pour obtenir des témoignages plus concrets de l'aspect et l'évolution des potentiels au cours du temps. Dans ces cas, on superpose sur un même cliché deux expositions (1/10 s, f : 5,6) correspondant aux sciatiques droit et gauche d'un même animal, l'un traité et l'autre servant de témoin (Fig. 21).

B) Résultats :

128 nerfs provenant de 64 grenouilles ont été étudiés au total sur une durée minimale de 30 h après le prélèvement et parfois sur des temps beaucoup plus longs (jusqu'à dix jours) pour vérifier les conditions de conservation. Des statistiques ont été calculées aux temps 3, 6 et 30 h.

1.— Evolution des paramètres mesurés chez les nerfs témoins :

Pendant la durée des observations, les paramètres mesurés ne restent pas stables chez les témoins : l'excitabilité et la vitesse de conduction augmentent pendant les premières heures, au cours de la conservation en Ringer à 20° C, constatation déjà faite par d'autres auteurs (SAMS - 1967). Puis surviennent progressivement des modifications contraires qui font qu'à la trentième heure, les valeurs mesurées deviennent à nouveau proches des chiffres obtenus après 3 heures. Nos conditions de conservation en Ringer étaient les suivantes : 20° C environ pour les 6 ou 8 premières heures, puis 20° C de la 8ème à la 29ème heure. Les mesures à 30 heures étaient faites après réchauffement à la température du laboratoire pendant une heure au moins. Le Ringer était remplacé par du liquide neuf à la 8ème heure. Les résultats partiels pour chaque série de témoins figurent sur les tableaux XXXV à XL. Les résultats d'ensemble pour les témoins sont regroupés sur la figure 22.

La conservation dans les conditions indiquées est bonne et la figure 23 montre l'évolution des principaux paramètres de trois nerfs conservés à 20° C pendant

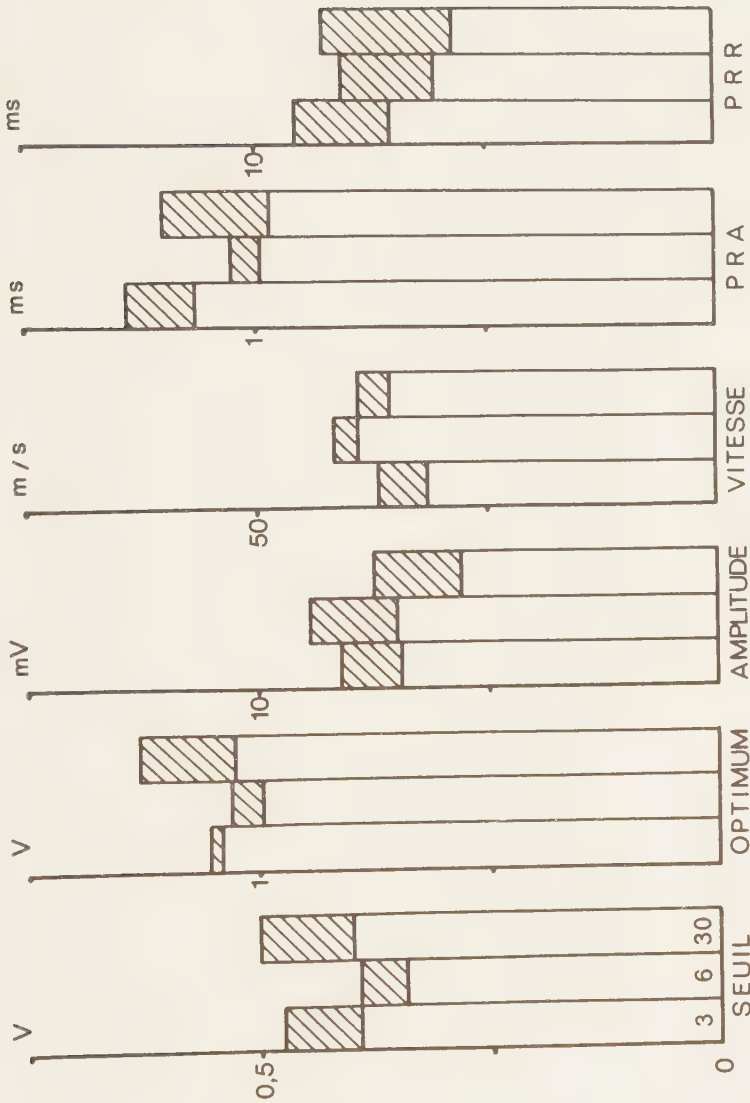


FIGURE 22: Evolution des paramètres mesurés sur les nerfs témoins, aux temps 3, 6 et 30h. La zone hachurée représente les limites supérieure et inférieure des moyennes observées dans les six sous-groupes expérimentaux explorés. (64 nerfs au total). Seuil et optimum: de la stimulation; amplitude et vitesse de conduction: du potentiel d'action; PRA: période réfractaire absolue; PRR: période réfractaire relative.



FIGURE 23: Evolution au cours du temps des paramètres mesurés sur trois nerfs sciatiques de Grenouille témoins. Abscisses: temps en jours. Ordonnées: optimum et seuil de stimulation: volts; amplitude du potentiel: millivolts; vitesse de conduction: mètres/seconde; périodes réfractaires: millisecondes (PRA: absolue, échelle 1 ms; PRR: relative, échelle 10 ms).



FIGURE 24: Courbes intensité-durée du stimulus mesurées à 3 et 30 h sur un lot de 20 nerfs sciatiques témoins. Largeur des impulsions employées: 20, 40, 60, 80, 100, 200, 300 et 500 microsecondes.

TABLEAU XXXV : Action du PF-68 à 10 % sur la conduction dans le nerf de Grenouille. Dans chaque case : moyenne,
nombre, variance.

TEMPS	3 h		6 h		30 h	
	T	PF-68	T	PF-68	T	PF-68
Seuil (m V)	456 8 8.884	519 8 7.098	353 8 4.006	425 8 14.285	414 7 3.928	507 7 31.190
Optimum (m V)	1.100 8 11.428	1.156 8 19.598	1.000 8 34.285	1.075 8 19.285	1.057 7 22.857	1.500 7 530.000
Amplitude à l'optimum (m V)	8,2 8 2,78	10,2 8 2,13	8,4 8 2,60	8,6 8 6,56	7,1 7 1,50	6,5 7 6,41
Conduction (ms pour 20 mm)	0,632 7 0,0073	0,647 7 0,0049	0,480 7 0,00282	0,608 7 0,0078	0,560 6 0,0014	0,751 6 0,0077
P R A (ms)	1,28 8 0,030	1,32 8 0,334	1,05 8 0,005	1,41 8 0,087	1,20 7 0,016	1,63 7 0,056
P R R (ms)	7,1 8 3,57	10,7 8 18,28	7,9 8 3,28	10,4 8 21,14	7,6 7 5,66	11,3 7 21,66

TABLEAU XXXVI: Action du PF-68 à 25 % sur la conduction dans le nerf de Grenouille. Dans chaque case :

moyenne, nombre, variance.

TEMPS	3 h		6 h		30 h	
	T	PF-68	T	PF-68	T	PF-68
Seuil (m V) stimulation	475 10 3.472	700 8 15.700	385 10 2.200	830 5 37.000	460 10 3.222	- - -
Stimulation optimale (m V)	1.100 10 11.100	1.587 8 258.400	1.020 10 4.000	1.640 5 123.000	1.080 10 10.666	- - -
Amplitude à l'optimum (m V)	7,9 10 6,48	6,3 10 13,17	8,9 10 4,07	2,1 7 4,71	7,5 10 4,85	0 0 0
Conduction à l'optimum (ms pour 25 mm)	0,706 10 0,0020	1,081 8 0,0266	0,612 10 0,0042	1,256 5 0,1191	0,641 10 0,0017	- - -
P R A (ms)	1,27 10 0,032	2,27 8 0,437	0,99 10 0,014	2,62 5 0,152	1,00 10 0,002	- - -
P R R (ms)	8,9 10 25,00	24,5 8 147,42	7,9 10 67,55	25,4 5 83,50	8,3 10 3,56	- - -

TABLEAU XXXVII : Action du PEG 6000 à 10 % sur la conduction dans le nerf de Grenouille. Dans chaque case : moyenne, nombre, variance.

TEMPS	3 h		6 h		30 h	
	T	PEG	T	PEG	T	PEG
Seuil (m V) stimulation.	407 7 5.357	394 8 15.312	342 7 3.690	341 8 10.469	400 7 44.166	350 8 23.571
Stimulation : optimale (m V)	1.100 7 30.000	975 8 65.000	1.000 7 26.666	900 8 68.571	1.266 6 138.666	1.171 7 19.047
Amplitude à l'optimum (m V)	7,5 7 4,87	11,5 8 7,81	7,0 7 4,70	11,5 8 5,07	5,6 6 3,60	8,5 7 11,66
Conduction à l'optimum (ms pour 20 mm)	0,585 6 0,0021	0,635 7 0,0061	0,513 6 0,0025	0,597 7 0,0052	0,548 5 0,0013	0,700 6 0,0058
P R A (ms)	1,22 7 0,096	1,22 8 0,043	1,04 7 0,006	1,10 8 0,025	1,05 6 0,008	1,17 7 0,016
P R R (ms)	7,6 7 2,89	7,9 8 6,14	6,7 7 3,66	8,0 8 3,42	6,3 6 4,00	8,4 7 4,33

moyenne, nombre, variance.

TEMPS	3 h		6 h		30 h	
	T	PEG	T	PEG	T	PEG
Seuil (mV) stimulation.	450 7 6.600	728 7 26.500	385 7 2.262	1.275 6 1.951.750	435 7 3.900	- 11 -
Stimulation optimale (m V)	1.085 7 11.400	1.907 7 583.700	1.028 7 5.700	1.620 5 362.000	1.085 7 11.400	- 11 -
Amplitude à l'optimum (m V)	6,9 7 6,87	5,3 7 9,64	7,0 7 7,93	4,8 7 30,33	6,5 7 6,80	0 11 0
Conduction à l'optimum (ms pour 25 mm)	0,711 7 0,0021	1,394 7 0,0594	0,617 7 0,0013	1,502 12 0,2498	0,657 7 0,0059	- 11 -
P R A (ms)	1,20 7 0,020	2,88 7 0,491	1,02 7 0,007	2,20 5 1,395	1,01 7 0,002	- 11 -
P R R (ms)	9,1 7 1,16	25,0 7 58,33	8,1 7 3,83	20,0 5 302,00	8,5 7 2,33	- 11 -

**TABLEAU XXXIX : Action de la PVP 11000 à 10 % sur la conduction dans le nerf de Grenouille. Dans chaque case :
moyenne, nombre, variance.**

TEMPS	3 h		6 h		30 h	
	T	PVP	T	PVP	T	PVP
Seuil (m V) stimulation.	462 8 6.250	431 8 14.241	375 8 714	369 8 4.241	500 6 3.000	575 6 37.750
Stimulation optimale (m V)	1.094 8 24.598	1.000 8 45.714	1.062 8 25.535	975 8 39.285	1.167 6 22.666	1.283 6 150.666
Amplitude à l'optimum (m V)	8,0 8 7,03	9,7 8 24,85	8,2 8 10,00	8,7 8 13,14	7,3 6 1,46	5,4 6 14,15
Conduction à l'optimum (ms pour 20 mm)	0,552 7 0,0026	0,665 7 0,111	0,497 7 0,0027	0,745 7 0,0091	0,521 6 0,0022	0,791 6 0,301
P R A (ms)	1,13 8 0,008	1,27 8 0,022	1,01 8 0,002	1,15 8 0,020	1,01 6 0,002	1,35 6 0,084
P R R (ms)	7,1 8 7,00	10,7 8 20,28	6,1 8 4,14	12,5 8 14,28	5,7 6 5,60	10,2 6 2,60

TABLEAU XI : Action de la PVP 11000 à 15 % sur la conduction dans le nerf de Grenouille. Dans chaque case :
moyenne; nombre, variance.

TEMPS	3 h			6 h			30 h		
	T	PVP		T	PVP		T	PVP	
Seuil (m V) stimulation	392 7 1.200	585 7 13.100		392 7 1.200	616 6 96		428 7 3.200	587 4 18.900	
Stimulation optimale (m V)	1.000 7 500	1.185 7 28.100		1.000 7 500	1.283 6 17.600		1.085 7 11.400	1.475 4 142.500	
Amplitude à l'optimum (m V)	7,5 7 2,25	7,5 7 8,91		7,5 7 2,61	7,0 12 11,58		7,1 7 3,51	4,5 5 9,50	
Conduction à l'optimum (ms pour 25mm)	0,680 7 0,1133	1,105 7 1,4000		0,617 7 0,0029	1,216 12 0,0201		0,647 7 0,0028	1,367 4 0,2513	
P R A (ms)	1,16 7 0,610	1,97 7 0,256		1,02 7 0,010	1,90 6 0,132		0,97 7 0,003	1,55 4 0,176	
P R R (ms)	8,2 7 2,00	15,5 7 20,33		8,0 7 2,33	16,5 6 32,80		8,4 7 4,00	14,5 4 27,66	

TABLEAU XLI : Action des polymères à 10 et 25 % dans le Tyrode sur la conduction dans le nerf de Grenouille.

Valeurs moyennes relatives par rapport aux témoins. Successivement dans chaque case : PF-68, PEG 6000, et PVP 11000.

TEMPS	3 h			6 h			30 h		
	10 %	25 %		10 %	25 %		10 %	25 %	
Seuil de stimulation	1,13 0,96 0,93	1,47 1,61 1,49		1,20 0,99 0,98	2,15 3,31 1,57		1,22 0,87 1,15	- - 1,37	
Stimulation optimale	1,05 0,88 0,91	1,44 1,75 1,18		1,07 0,90 0,91	1,60 1,57 1,28		1,41 0,92 1,05	- - 1,35	
Amplitude à l'optimum	1,24 1,53 1,21	0,79 0,76 1,00		1,02 1,64 1,06	0,23 0,68 0,93		0,91 1,51 0,73	0 0 0,63	
Vitesse de conduction	0,976 0,921 0,830	0,653 0,510 0,615		0,789 0,859 0,667	0,487 0,410 0,507		0,745 0,782 0,658	- - 0,473	
P R A	1,03 1,00 1,12	1,78 2,40 1,69		1,34 1,05 1,13	2,64 2,15 1,86		1,35 1,11 1,33	- - 1,59	
P R R	1,50 1,03 1,50	2,75 2,74 1,89		1,31 1,19 2,04	3,21 2,50 2,06		1,48 1,33 1,78	- - 1,72	

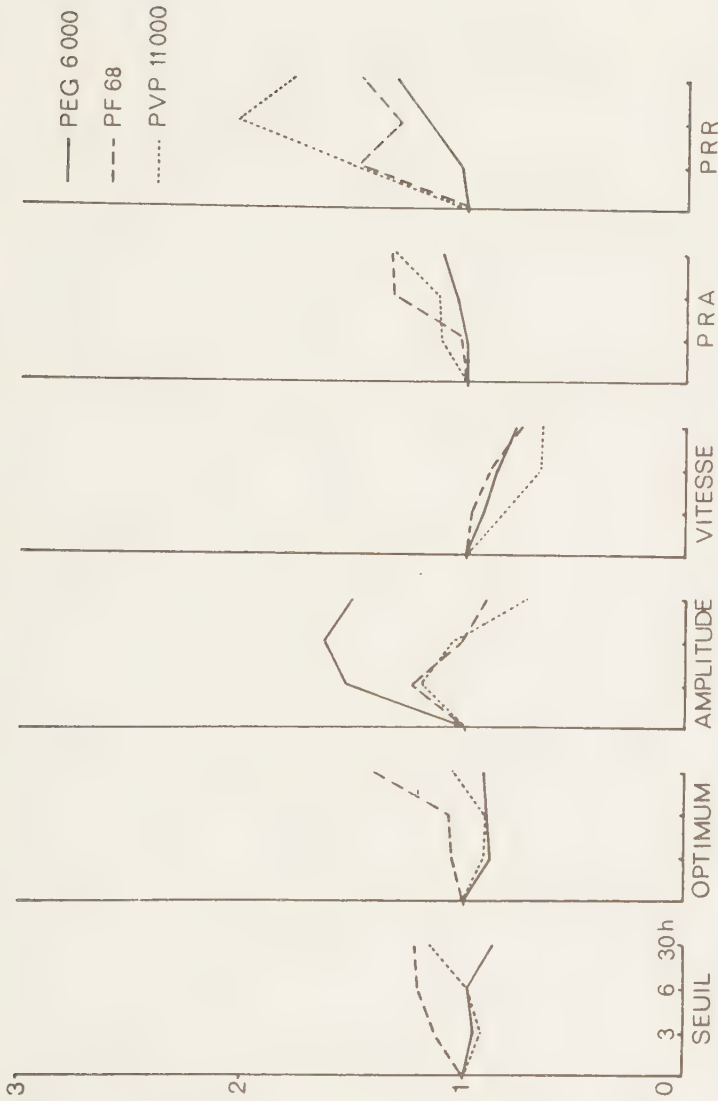


FIGURE 25: Evolution au cours du temps des paramètres mesurés sur le nerf sciatique isolé de Grenouille, au cours de l'action des polymères à concentration 10%. Abscisses: temps selon une échelle schématique. Ordonnées: valeurs relatives par rapport aux témoins aux mêmes temps. Seuil et optimum: de la stimulation; amplitude et vitesse: du potentiel d'action; PRA et PRR: périodes réfractaires absolue et relative.

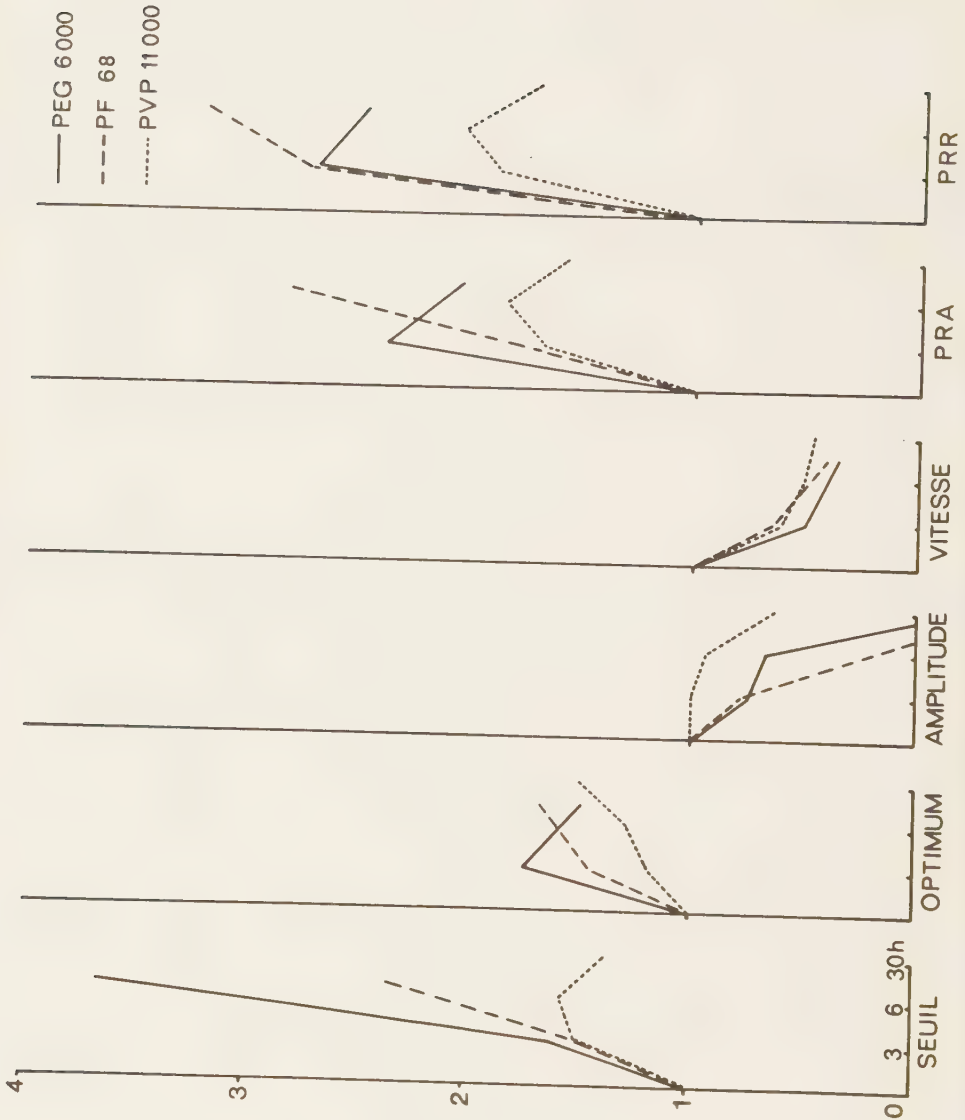


FIGURE 26: Evolution au cours du temps des paramètres mesurés sur le nerf sciatique isolé de Grenouille, au cours de l'action des polymères à concentration 25%. Echelles comme figure 25; expression en valeurs relatives par rapport aux témoins aux mêmes temps.

dix jours et réchauffés chaque fois à 20° C pour la mesure. Le Ringer est changé tous les jours ; les opérations se font sans précaution d'asepsie.

Enfin, la courbe intensité-durée pour une réponse donnée, de l'ordre de 75 pour 100 de la réponse maximale, est schématisée sur la figure 24 pour 3 et 30 heures. Ces courbes ont été tracées à partir des données de 20 sciatiques témoins

2.— Action des polymères :

L'action des polymères est exprimée en valeurs absolues dans les tableaux XXXV à XL. Etant donné les variations chez les témoins pendant le même temps, il est plus facile de les étudier en traçant des courbes d'évolution en valeur relative par rapport aux témoins, ce qui a été fait dans les figures 25 et 26 avec les résultats portés dans le tableau LXI.

a) PF-68. L'excitabilité est progressivement diminuée au cours du temps, légèrement avec la concentration 10 p. 100, et fortement avec la concentration 25 p. 100, comme en témoigne la suppression complète de l'influx après 30 heures (l'excitabilité est appréciée d'après les valeurs du seuil de stimulation et de l'optimum de stimulation). L'arrêt de la conduction se produit entre la 4ème et la 10ème heure d'immersion dans le milieu enrichi en polymère (8 h.30 en moyenne). Les valeurs indiquées dans les tableaux pour la 6ème heure correspondent évidemment aux nerfs pour lesquels un potentiel est encore présent à ce moment.

L'amplitude du potentiel observé décroît progressivement, lentement pour la faible concentration, rapidement avec la plus forte. La vitesse de conduction diminue, tandis que les périodes réfractaires s'allongent. La conduction cesse en général lorsque la vitesse de propagation est devenue environ deux fois plus faible que la normale.

b) PEG 6.000. Les phénomènes observés sont comparables aux effets du PF-68, bien que quantitativement différents. A la concentration 10 pour 100, le polymère ne diminue pas l'excitabilité, et il aurait même tendance à l'augmenter ; l'amplitude du potentiel est également augmentée de façon fort nette et jusqu'à 30 heures. A la concentration 25 p. 100, l'excitabilité est diminuée plus fortement qu'avec le PF-68. L'amplitude est également diminuée et la conduction cesse après quelques heures (9 heures en moyenne), comme avec le PF-68. La vitesse de conduction est simultanément diminuée, modérément à concentration 10 p. 100 (action identique ou plus forte que celle de PF-68). Les périodes réfractaires sont allongées.

c) PVP 11.000 : L'excitabilité est peu affectée à la concentration 10 p. 100 ; elle est diminuée, moins fortement qu'avec les autres polymères, à concentration 25 p. 100. L'amplitude diminue progressivement avec le temps, moins qu'avec les autres polymères. La vitesse de conduction est ralentie : à concentration 10 p. 100, l'action est plus forte qu'avec PF-68 et PEG 6.000 ; à concentration 25 p. 100, elle est comparable au début, puis nettement plus faible que pour les autres polymères. Il n'y a jamais d'arrêt de la conduction, ce qui différencie nettement la PVP ; les périodes réfractaires sont allongées.

C) Discussion

1.— Matériel

La part du matériel dans la reproductibilité des mesures est évidemment importante. Le stimulateur est dans notre équipement le maillon le moins élaboré de la chaîne de mesure et c'est donc lui qui conditionne le seuil inférieur de précision. La non-concordance des indications des cadrans gradués du ST II C avec les temps réels n'est pas gênante, puisqu'on peut contrôler en permanence les temps et les amplitudes sur l'oscilloscope. La discordance n'est d'ailleurs que peu importante, et elle est inévitable avec un appareil de cette classe de qualité. Ce qui nous a davantage gêné est une légère modulation de l'amplitude et de la durée du stimulus par un phénomène de battements avec la fréquence du secteur. Lorsque le stimulus est appliqué avec une fréquence différente des multiples ou sous-multiples de la fré-

quence secteur, on observe une modulation en amplitude et en largeur de l'ordre de 5 à 10 p. 100 qui peut influencer légèrement la réponse du nerf. De plus cette pulsation est gênante pour la photographie, et c'est pourquoi les clichés ont le plus souvent été pris avec une fréquence de stimulation de 50 Hz. Les mesures ont toujours été effectuées à 20 Hz de manière à fatiguer le moins possible le nerf, car il arrive, surtout sur les nerfs traités aux polymères, à conduction ralentie, que les caractéristiques de l'influx soient un peu différentes quand la fréquence de stimulation augmente. Sur les nerfs normaux, par contre, il n'y a pas de différence entre les résultats obtenus à 50 et 20 Hz, et l'on a toujours vérifié, pour les clichés présentés, que cette condition était réalisée.

2.— Manoeuvres expérimentales :

On peut se demander dans quelle mesure les paramètres de l'influx sont affectés par les conditions de manipulation du nerf, c'est-à-dire le fait d'enlever et remettre la préparation sur les électrodes. Pour évaluer cette reproductibilité, nous avons placé et enlevé successivement dix fois de suite le même nerf dans la cuve, en prenant à chaque fois un cliché sur le même film. Entre chaque mise en place, le nerf était trempé dans son récipient de Ringer, comme c'est le cas lors des mesures réelles. Le résultat est illustré par la figure 27, qui montre les 10 poses successives de 1/25 à f 5,6, avec stimulation 40 μ s, 1V, 50 Hz. Le cliché était pris à chaque fois 5 s. après le début de la stimulation. On peut considérer que la reproductibilité est satisfaisante, compte tenu du fait que les interprétations sont toujours faites sur des moyennes et non des valeurs individuelles (sauf actions spectaculaires). Les légères variations de vitesse de conduction peuvent être imputées en partie à des variations spontanées, en partie à de légères différences dans la tension du nerf lors de son dépôt sur les électrodes. Seules les propriétés mécaniques du nerf conditionnent cette tension puisqu'on le pose dans la cuve en le faisant glisser par traction sur le fil d'ancrage jusqu'à ce qu'il repose convenablement sur le jeu d'électrodes en service. Il est donc possible qu'apparaisse d'une mesure à l'autre une légère différence de longueur de membrane nerveuse intéressée par les électrodes, se traduisant par une différence de temps de conduction et donc de vitesse apparente de propagation du spike.

3.— Conservation :

Il est tout à fait remarquable de constater une fois de plus la robustesse du nerf de Grenouille, qui en fait une préparation de choix pour les études de conduction. Une conservation satisfaisante de plusieurs jours peut être obtenue au froid, pourvu que l'on prenne soin de changer le milieu toutes les vingt-quatre heures environ. L'acidification qui survient au cours de la conservation, due vraisemblablement au métabolisme du nerf, et aussi à celui des bactéries présentes, semble un des principaux facteurs de détérioration. En utilisant un milieu de survie aseptique, il serait sûrement possible de prolonger encore ce délai de conservation. J. A. THOMAS (1947) a utilisé avec succès un milieu contenant une solution saline, des antibiotiques et une solution nutritive d'acides aminés, nucléiques et de vitamines, pour la survie d'organes isolés de Batraciens (parties de membres, blastèmes de régénérations, branchies). Il serait sans doute possible d'essayer un milieu de ce type pour la conservation du nerf. Il serait également intéressant de rechercher si la stimulation périodique n'est pas nécessaire au maintien de l'intégrité physiologique et structurale pendant la conservation. Nous avons en effet souvent observé après un long temps de conservation, que la stimulation, peu efficace pendant les premières secondes, devenait petit à petit plus active, comme si l'intégrité physiologique se rétablissait progressivement au cours du fonctionnement. La transmission d'un certain nombre d'influx par unité de temps pourrait être nécessaire à un fonctionnement optimal de la pompe ionique, la membrane récupérant d'elle-même sa structure au cours des échanges d'énergie

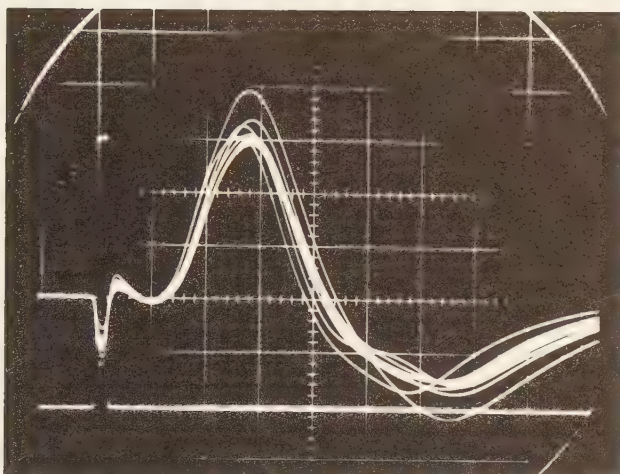


FIGURE 27: Essai de reproductibilité technique des mesures de conduction sur le nerf isolé. Dix poses successives ont été enregistrées sur un même cliché, avec le même nerf et dans les mêmes conditions de stimulation (1 V, 40 microsecondes, 50 par s). Entre chaque pose, le nerf était enlevé de la cuve de mesure et transféré dans un godet contenant du liquide de Ringer. La reproductibilité paraît satisfaisante. Abscisses: 0,2 ms/cm; ordonnées: stimulus: 0,2 V/cm, potentiel 2mV/cm.

liés à la stimulation. La généralisation du phénomène conduirait à rechercher le rôle du fonctionnement dans la conservation du tissu musculaire, ce qui pourrait être important dans le cas du cœur.

4.— Mécanisme d'action :

Le plus important est évidemment de tenter d'aborder le mécanisme par lequel les polymères modifient les propriétés conductrices du nerf. Les conceptions actuelles du spike, dérivées des études classiques de HUXLEY, considèrent que le potentiel comporte d'abord une augmentation subite et spécifique de la conductance sodium (G_{Na}), provoquant un flux entrant d'ions Na^+ poussés par le gradient électro-chimique d'environ 110 mV dû à la différence de concentration. Ce flux entrant rend l'intérieur de l'axone positif par rapport à l'extérieur et représente sur l'enregistrement la partie ascendante du spike. Ensuite, se produit le retour de la membrane à l'état de faible G_{Na} , avec augmentation de la conductance potassium (G_K). Finalement, un flux sortant d'ions K^+ , produit par l'augmentation des charges positives dans l'axone par suite de l'entrée de Na^+ , conduit à la reprise de la polarisation de repos. C'est seulement ultérieurement que Na^+ et K^+ déplacés pendant le spike sont pompés par le système d'échanges d'ions membranaire et ce processus n'est pas indispensable pour que d'autres spikes soient produits immédiatement.

La conduction dans le nerf nécessite que la libération d'énergie en un point déterminé déclenche une réaction semblable en un point voisin et ainsi de proche en proche. On peut ainsi s'attendre à ce que la vitesse de conduction soit proportionnelle à la distance à laquelle une réponse locale peut déclencher la réponse suivante. Cette distance de déclenchement semble déterminée principalement par les courants locaux, dus à la redistribution des ions au-dessus et au dessous de la membrane autour du point d'action. Ces tensions latérales diminuent rapidement avec la distance au site du spike, et leur diminution relative en un point donné est une propriété de la membrane et des électrolytes présents. Dans le cas d'un spike, les courants latéraux sont souvent assez intenses pour déclencher un autre spike à une distance allant jusqu'à plusieurs millimètres (DU PRAW, 1968). En principe, la distance d'excitation doit être plus grande si la résistance membranaire est forte, c'est-à-dire si les fuites d'ions se produisent peu. Ainsi les fibres myélinisées sont-elles plus rapides. Dans cette optique, on peut donc envisager que la diminution de vitesse de conduction amenée par les polymères soit due à une diminution de la résistance de membrane, par suite de fuites ioniques accrues ou par altération des structures myéliniques. Mais la largeur du spike elle-même paraît affectée, pour autant que l'on puisse en juger sans micro-électrodes, ainsi que les périodes réfractaires, et il est plus vraisemblable d'envisager un ralentissement des échanges ioniques au cours des modifications de G_{Na} et de G_K .

5.— Comparaison avec d'autres agents bloquant la conduction

De très nombreuses substances modifient la conduction nerveuse et il convient d'en rapprocher nos résultats. TOMAN (1952) a donné une bonne discussion de la neuro-pharmacologie du nerf périphérique. Parmi les substances actives, nous considérerons d'abord les anesthésiques locaux, puis les anesthésiques généraux, les déprimeurs et excitants du système nerveux central, les facteurs métaboliques, enfin diverses substances d'actions variées.

a) Anesthésiques locaux : GASSER et ERLANGER (1929) ont montré que le blocage de la conduction produit par la cocaïne apparaît d'abord dans les petites fibres non myéliniques d'un tronc nerveux, qui renferment probablement les fibres intéressées dans la transmission de la douleur, et plus tard seulement dans les fibres larges et myélinisées de conduction rapide, les fibres motrices étant les plus résistantes. Il est à noter que cet ordre de blocage n'est pas le même que celui qui est produit par une pression mécanique. Les anesthésiques

locaux bloquent la conduction en interférant avec le processus fondamental de l'excitation, c'est à dire la rapide augmentation transitoire de perméabilité aux ions sodium qui est produite par une petite dépolarisation de la membrane. La perméabilité de repos du nerf aux ions sodium et potassium est également diminuée, ce qui fait que le potentiel de repos n'est pratiquement pas modifié (in GOODMAN et GILMAN, 1965). La xylocaïne, la procaine augmentent le seuil d'excitation ; avec la procaine, le blocage apparaît dans les fibres A et C quand le seuil est approximativement doublé et la vitesse de conduction divisée par 2. Il est à noter que l'attaque préférentielle des fibres les plus fines n'est pas recon nue dans tous les cas. Dans le nerf vague du Lapin, une solution à 1 mM déprime d'abord les fibres A et ensuite seulement les fibres C. La procaine déprime également tous les tissus excitables périphériques et peut être plus efficace sur la conduction dans le muscle squelettique que sur le nerf. Une certaine toxicité en découle, qui peut se manifester par un arrêt cardiaque en cas de surdosage (BENNETT et CHINBURG, 1946 ; INOUE et FRANK, 1962). Notons que la cocaïne est capable de restaurer la conduction, transitoirement, dans le nerf de grenouille plongé dans un milieu sans sodium (LORENTE DE NO, 1951). Cet auteur considère la possibilité d'une compétition de la cocaïne dans le processus chimique par lequel l'ion sodium maintient l'excitabilité.

b) Anesthésiques généraux : L'éther éthylique semble avoir une action dépolarisante sur la membrane nerveuse. Une chute du potentiel de membrane a été trouvée sur le nerf de grenouille. Lorsque cette diminution dépasse 15 p. 100 de la valeur de repos, la conduction n'a plus lieu. Le chloroforme a été moins étudié que l'éther, mais semble agir par le même mécanisme. Il a été dit qu'il ralentissait la conduction, en plus de son action dépolarisante. L'alcool éthylique semble également être un agent dépolarisant ; le blocage se produit lorsque la concentration d'alcool atteint 1 à 2 M, et que le potentiel de membrane a chuté de 12,5 mV. Les uréthanes donnent un blocage de la conduction similaire à celui obtenu par l'anoxie, les fibres B étant les plus sensibles, les fibres A intermédiaires et les fibres C les moins sensibles.

Le cas des anesthésiques gazeux est particulièrement intéressant ici, car une théorie faisant intervenir le blocage de l'eau a été avancée à propos des gaz rares. Certains gaz sont bien connus en clinique, comme le cyclopropane, l'éthylène, le protoxyde d'azote ; avec d'autres il faut parfois une pression gazeuse très élevée pour obtenir l'interruption de conduction. Par exemple, il faut 300 atmosphères d'argon pour obtenir un effet équivalent à celui de 2 atmosphères de cyclopropane. Le xénon sous 12 atmosphères donne un blocage total de la conduction dans les fibres myélinisées périphériques (CARPENTER, in BUNKER et VANDAM, 1965), et inhibe seulement de 57 p. 100 l'utilisation de l'oxygène par la fibre. Des quantités équivalentes de cyclopropane et de protoxyde d'azote diminuent la respiration de 50 et de 65 p. 100. Il est à noter que ces gaz n'empêchent pas la consommation du pyruvate par le nerf, lors du blocage de la conduction, contrairement à ce qui se passe avec le phénobarbital par exemple. Il ne s'agit donc pas d'un effet purement métabolique.

En présence d'un gaz anesthésique comme le Xénon, le nombre des molécules d'eau associées avec les protéines peut varier. Ainsi l'hémoglobine fixe environ 330 molécules d'eau au lieu de 300, lorsque du Xénon est présent (FEATHERSTONE et Coll., 1961). Ces données correspondent avec la structure des clathrates proposée par PAULING (1961) et par MILLER (1961).

Les clathrates sont des associations physiques de deux ou plusieurs types de molécules, dans lesquelles il peut y avoir en fait seulement une très faible attraction d'une des espèces moléculaires par l'autre. Les molécules sont associées par formation d'une structure analogue à une cage formée par les molécules d'un

des composés autour d'un atome ou d'une molécule de l'autre composé. Ces structures forment ainsi des sortes de réseaux dans lesquels se trouvent des cavités qui peuvent véritablement "piéger" d'autres molécules de taille adéquate. La présence de molécules piégées peut éventuellement stabiliser la structure (FEATHERSTONE et MUEHLBAECHER, 1963). Des hydrates de Xénon $\text{Xe} \cdot 5 \frac{3}{4} \text{OH}_2$ et $\text{Xe} \cdot 17 \text{OH}_2$ peuvent ainsi se former, ainsi que des hydrates d'autres gaz, comme le chloroforme (PAULING, 1961). Le mécanisme de la narcose ne peut pas être simplement la formation de micro-cristaux d'hydrate dans le tissu nerveux, car par exemple le chlorure de méthyle est narcotique pour les Mammifères sous 0,14 atmos. à 37° C, tandis que les cristaux d'hydrate ne sont stables à cette température qu'au dessus de 40 atmosphères. Le rôle d'agents stabilisants comme les chaînes latérales des protéines, et les petites molécules des liquides biologiques a été proposé par PAULING.

c) Barbituriques et anticonvulsivants

Parmi les barbituriques, le nembutal a été étudié sur le nerf de Grenouille par HEINBECKER et BARTLEY (1940). L'action montre une augmentation du seuil, une réduction de l'amplitude du potentiel d'action et du potentiel négatif tardif, une prolongation des périodes réfractaires absolues et relatives et un ralentissement de la vitesse de conduction. Les barbituriques produisent le blocage de conduction dans le sciatique de grenouille à des concentrations de 15 à 30 mM. (TOMAN, 1952). Cet auteur a décrit quelques phénomènes intéressants à propos des anticonvulsivants : lorsqu'un nerf sciatique de grenouille neuf est stimulé de manière excessive et répétée, le seuil tombe à environ la moitié de sa valeur, puis se rétablit après une période d'une minute environ. En même temps, il apparaît des décharges répétitives des fibres A en réponse à des chocs uniques. Un pré-traitement avec un certain nombre de drogues anticonvulsivantes abolit ces effets à des doses relativement basses. Ainsi, la diphénylhydantoïne a une action visible à des concentrations de 0,04 mM et s'oppose aux effets excitants du phosphate, du citrate et de l'oxalate. Le blocage de la conduction ne se produit pas avec les anticonvulsivants avant que les concentrations n'atteignent environ 20 mM. Les solutions saturées de diphénylhydantoïne ont peu d'effet sur le seuil ou la conduction, mais les solutions saturées de phénurone (phénylacétylurée, 3 mM) augmentent un peu le seuil.

d) Excitants du système nerveux central

La strychnine produit une augmentation modérée du seuil, et un ralentissement de la vitesse de conduction à une concentration de 30 mM ; elle n'a pas d'action en dessous de 6 mM. D'après WALL et HORWITZ, 1951, la strychnine est capable d'augmenter l'amplitude du potentiel d'action. En dépit de ses effets excitants centraux, l'amphétamine semble être essentiellement déprimante sur le nerf de grenouille. A la concentration de 2 mM, elle arrête les décharges répétées provoquées par le phosphate, et à 10 mM elle commence à augmenter le seuil normal.

e) Agents métaboliques

L'oxygène est la seule substance qui soit complètement indispensable au nerf pour maintenir son potentiel de membrane, car les métabolites nécessaires semblent inclus dans la structure du nerf. L'anoxie diminue lentement le potentiel de membrane après une période préliminaire dans laquelle les réserves déjà oxydées sont utilisées. La pression partielle d'oxygène doit tomber à une valeur très basse (environ 0,5 p. 100) avant que la dépolarisation ne se produise. La consommation d'oxygène est très basse comparée à celle de la plupart des tissus (nerf de grenouille : 0,10 cal/g/h au repos, et 0,18 cal/g/h pour l'activité maximum ; GERARD, 1946). La plupart des poisons métaboliques ont été essayés sur le nerf pour une raison ou pour une autre ; ils ont presque tous une action,

le plus souvent déprimante, parfois excitante et les agents bloquant de manière différentielle certains métabolites ont des actions intéressantes mais souvent difficiles à prévoir dans la fonction des cellules nerveuses. Le glucose en solution isotonique, lorsque suffisamment de sodium est présent, a peu d'effets importants sur le nerf, exceptés ceux qui peuvent être dus à une action sur la résistance longitudinale et la résistance membranaire due à la réduction de conductivité. Pour TOMAN (1952), le glycérol ne semble pas avoir d'effet, et l'acétone une action déprimante inconstante en solution isotonique. L'acétate, le lactate, l'oxalate et le citrate produisent des décharges spontanées dans le nerf de grenouille. Le gaz carbonique par lui-même semble avoir une action sur le nerf ; pour certains auteurs il n'agit pas par la chute de pH ni par altération des complexes de calcium. Ces effets peuvent se produire en l'absence d'oxygène. Pour LORENTE DE NO, même du CO₂ pur ne détruit pas le nerf. Au contraire TOMAN trouve que le gaz carbonique pur double rapidement le seuil et le temps de conduction, ces effets n'étant pas toujours réversibles, même si l'exposition a été relativement courte. Pour LORENTE DE NO, le nerf est relativement insensible au changement de pH entre les limites de 5,5 et 8, et les effets du CO₂ et d'autres acides dans ce domaine sont des effets spécifiques plutôt que des effets reliés à la concentration en ions hydrogène. En dessous de pH 3, il y a un blocage de la conduction, au-dessus de pH 8 des salves spontanées se produisent. TOMAN (1952) préfère maintenir le pH à environ 7,3 pour la plupart des observations. Dans nos observations personnelles, l'abaissement du pH à 6,5 ou 6 paraît nuire à la conservation.

f) Equilibre ionique

Le sodium joue un rôle vital dans le maintien de l'excitabilité ; pour le nerf de grenouille, une concentration de 17 mM est adéquate pour maintenir une fonction normale pour autant que l'osmolarité (110 mM) soit maintenue par des ions neutres, tels que l'acétylcholine, la choline ou la métacholine.

Beaucoup de composés à ammonium quaternaire possédant au moins deux groupes éthyle (par exemple le tétra-éthyl ammonium) peuvent remplacer en partie le sodium. Dans le nerf myélinisé, la taille du potentiel d'action varie d'une manière relativement directe en fonction de la concentration en sodium. En ce qui concerne la concentration en potassium, le nerf de grenouille fonctionne mieux lorsque le liquide de RINGER contient 5 mM de chlorure de potassium au lieu de 1,3 mM. Le potassium est capable de bloquer la conduction ; les fibres A sont affectées les premières, et les fibres C plus tard, mais ces relations sont variables suivant les nerfs. La dépolarisation n'est pas complète en-dessous de 50 mM de potassium. Les actions du potassium consistent en dépolarisation et réduction de la résistance de la membrane.

Le calcium produit une augmentation du seuil, une augmentation du spike, et un ralentissement de la conduction. Le blocage peut être amélioré d'abord par l'anoxie, puis par un train d'impulsions. Le magnésium agit de la même façon mais de manière moins marquée. Le baryum a une action dépolarisante à des concentrations allant de 3,7 à 43 mM. Les fibres A sont plus sensibles que les fibres C.

g) Agents divers

L'acétylcholine a très peu d'action sur le nerf périphérique. LORENTE DE NO (1944) a démontré qu'une solution isotonique de chlorure d'acétylcholine pouvait être employée à la place de la solution de RINGER comme milieu de survie pour le nerf et que le potentiel de membrane était maintenu dans cette solution si de petites quantités d'anticholinestérase étaient ajoutées pour prévenir l'hydrolyse. En ajoutant une petite quantité de sodium (0,022 M), l'excitabilité est aussi maintenue. Si l'on n'ajoute pas d'inhibiteur de la cholinestérase, on obtient une détérioration irréversible du nerf.

Les anticholinestérases, comme par exemple le D.F.P. (di-isopropylfluorophosphate) bloquent la conduction dans les fibres de vertébrés et d'invertébrés. La conduction peut être restaurée par lavage, et une partie de l'activité cholinestérasique est rétablie dans ces conditions. L'ésérine bloque également la conduction d'une façon parallèle avec ses propriétés de dépression de la cholinestérase (BULLOCK, 1947). Nous n'avons pas de raisons de penser à un effet anticholinestérasique pour les polymères, puisqu'ils inhibent in vitro les contractions musculaires induites par l'acétylcholine.

Le tétraéthylammonium, agent efficace de blocage des ganglions du système nerveux autonome, a un effet stimulant sur le nerf périphérique : abaissement du seuil d'apparition de décharges rythmiques évoquées et de décharges spontanées, diminution de vitesse et élargissement du potentiel de pointe dans les fibres A du sciatique de grenouille. Cet effet peut être aboli par des doses relativement faibles d'ésérine (TOMAN, 1952).

Le curare, la nicotine semblent avoir peu d'action sur les fibres périphériques. L'atropine a une forte action anesthésique locale, ce qui n'est pas surprenant si l'on considère la ressemblance de sa structure avec celle de la cocaïne. L'action bloquante de l'atropine semble être du type hyperpolarisant. Les toxines botulique et tétanique, extrêmement actives sur les plaques motrices, ne semblent pas altérer la conduction dans les fibres. Les anti-histaminiques ont en général une action bloquante. L'histamine n'a guère d'action. Le D.D.T. produit des décharges répétées persistantes dans les axones de crustacés, à concentrations faibles. Ces décharges sont supprimées par addition de calcium, de magnésium ou de potassium. La vératrine donne une grande augmentation du post-potentiel négatif, particulièrement après stimulation répétée, et finalement une dépolarisation. L'effet bloquant peut être augmenté par le potassium et antagonisé par le CO₂, le calcium et les anesthésiques locaux. La streptomycine, qui a produit des accidents destructifs sur la huitième de nerfs crâniens, produit un blocage de type dépolarisant dans le nerf de grenouille, mais seulement à concentrations très élevées (environ 40 mM).

h) Diméthylsulfoxyde

Bien que fort différent de nos polymères, le DMSO est intéressant car il a été très étudié au cours de ces dernières années, et il agit vraisemblablement par des mécanismes physiques qui mettent en jeu des modifications d'hydratation. SAMS (1967) a étudié l'action du DMSO sur la conduction du nerf sciatique de grenouille dans des conditions très proches des nôtres. En présence de DMSO à 6 p. 100 dans du liquide de RINGER, la vitesse de conduction est significativement diminuée après 1 h. et le reste pendant 5 h. Dans l'intervalle des mesures, les nerfs sont remis à chaque fois dans le Ringer ou le Ringer DMSO; comme nous, cet auteur observe que la vitesse de conduction augmente au cours du temps chez les témoins.

La baisse de vitesse est complètement réversible après 1 h de séjour en Ringer, lorsque le séjour en DMSO a duré de 30 minutes à 2 h. Au delà de ce temps, des expériences n'ont pas été faites.

La courbe intensité-durée a été déterminée en recherchant le voltage nécessaire pour donner une déflexion positive d'amplitude déterminée pour des durées allant de 0,002 ms. à 0,20 ms. Après 1 et 2 h de séjour en Ringer-DMSO, les courbes sont légèrement plus élevées que chez les témoins, mais d'une façon non significative. DAVIS, DAVIS et CLEMONS (1967), utilisant la préparation nerf-muscle gastrocnémien de grenouille, observent qu'en présence de DMSO, la tension de stimulation nécessaire pour obtenir une contraction musculaire minimale est augmentée, légèrement pour des concentrations modérées, et qu'il faut de 40 à 50 p. 100 de DMSO pour bloquer ces nerfs moteurs. Ces auteurs présen-

tent une interprétation intéressante, basée sur l'état d'hydratation et de charge des protéines du nerf. Dans cette hypothèse, une variation de l'hydratation en plus ou en moins se traduit d'abord par une hyperexcitabilité, puis par un blocage. Il en va de même dans une autre dimension avec les variations de charge produites par des produits anioniques ou cationiques. L'altération des charges se traduirait d'ailleurs par une modification de l'eau liée, car les groupes polaires orientent les molécules d'eau dans un sens ou dans l'autre selon leur polarité, et la réduction ou la destruction des charges aurait pour conséquence une réduction de l'eau liée. Ces conceptions sont très proches des hypothèses que nous formulons sur l'action bloquante des polymères hydrophiles. Pour DAVIS et Coll., elles sont confirmées par l'effet coagulant modéré du D.M.S.O sur les tests de recalcification du plasma.

CHAPITRE VI

ACTION DES POLYMERES SUR LE DEBIT BILIAIRE
ET L'EXCRETION DE LA BILIRUBINEA) Techniques

Des rats Wistar mâles subissent une fistule biliaire aiguë sous anesthésie à l'éthyluréthane (DEBRAY et Coll., 1962), l'animal étant thermorégulé (ROZE, 1964a). Le débit biliaire est mesuré par comptage photo-électrique des gouttes qui s'écoulent de l'extrémité libre du cathéter dans des récipients tarés. La pesée des échantillons est également effectuée et sert essentiellement aux calculs de débit pour la bilirubine. Nous avons discuté ailleurs (ROZE, 1964 b) de l'intérêt du comptage des gouttes sur les enregistrements par rapport aux pesées. La récolte des échantillons successifs est effectuée grâce à un petit collecteur de fractions construit spécialement à cet effet (1). Nous décrivons rapidement ce système, inédit, qui constitue une grosse amélioration par rapport aux dispositifs décrits dans notre Thèse de Médecine (ROZE 1964 b).

1.— Appareillage

Le collecteur est constitué d'un support surélevé où l'animal, fixé sur le dos sur une planchette mobile, est situé de façon convenable par rapport à deux compte-gouttes à cellule photo-électrique, situés chacun au dessus d'un chariot de recueil. Les deux chariots peuvent recevoir chacun douze tubes à hémolyse ou godets pour auto-analyseur Technicon. Ils se déplacent de gauche à droite et transversalement sous l'animal, celui-ci étant observé du dessus (côté ventral) et dans l'axe queue-tête. Les deux chariots sont totalement indépendants et constituent deux chaînes distinctes. Ils sont à l'origine prévus pour le recueil séparé de la bile et du suc pancréatique (une seule voie est utilisée dans les expériences décrites ici).

L'avance des chariots est obtenue par une crémaillère engrenée sur un pignon moteur, lui-même couplé à un moteur débrayable. Le positionnement impeccable du chariot sur le compte-gouttes après chaque avance est obtenu par un micro-switch actionné mécaniquement par des ergots fixés sur le chariot mobile. La partie électrique de commande comprend : les circuits de mise en forme de l'impulsion photo-électrique et des relais situés dans le collecteur et une boîte de commande annexe fonctionnant soit en minuterie, soit en unité de comptage de gouttes. L'avance du chariot peut finalement être commandée soit par la chute des gouttes (fractions de 1 à 99 gouttes), soit par minuterie (fraction toutes les 1 à 99 minutes). Une sortie d'enregistrement est annexée à chaque compte-gouttes. Elle délivre une impulsion rectangulaire positive d'amplitude environ 6 v et de durée 0,7 s environ (temporisation réglable) pour chaque chute de goutte, et une impulsion rectangulaire négative d'amplitude environ - 6 v et de durée égale au temps de rotation du moteur pour chaque avance du chariot. Sur chaque piste d'enregistrement (nous avons utilisé des scripteurs Sefram P 600 A) on distingue facilement sur une même piste, les tops positifs dus à la chute d'une goutte,

(1) Réalisé par la Société APELEC, 68 avenue de la République, Sartrouville.

et les tops négatifs correspondant à l'avance du chariot collecteur, ce qui permet un contrôle aisé de l'expérience.

2.— Conduite de l'expérience

Le recueil des échantillons de bile est effectué de 30 en 30 minutes, dans des godets "Technicon" de 2 ml, à fond conique, préalablement tarés. Les débits sont mesurés de 60 mn avant le temps "zéro" jusqu'à 180 mn après. Au temps zéro est démarrée l'injection de polymère, sous forme d'une perfusion dans la veine fémorale (perfuseur Braun, seringue de 5 ml, quantité injectée 5 ml en 11 minutes pour les solutions les plus diluées, 4 ml en 25 minutes pour les plus concentrées). Les solutions employées sont les suivantes : PF-68 à 10 p. 100 dans l'eau distillée (5 ml par animal), PF-68, PEG 6000, PVP 11000 à 10 p. 100 dans l'eau distillée additionnée d'une quantité de ClNa suffisante pour amener le Δt à $-0,56^{\circ}\text{C}$ (5 ml par animal) ; PF-68, PEG 6000, PVP 11000 à 25 p. 100 dans l'eau distillée (4 ml par animal). La concentration et le débit de la bilirubine sont évalués à l'auto-analyseur Technicon par la technique suivante (CHARIOT et ROZE, 1968), qui est une adaptation de la méthode de JENDRASSIK:

3.— Dosage de la bilirubine

a) Réactifs : 1/ Caféine (stable à 22°C) : Caféine 50 g, tartrate de Na 125 g, benzoate de Na 75 g, eau distillée q.s.p. 1 l. Dans un ballon d'un litre, dissoudre les trois produits dans 700 ml d'eau distillée, à l'aide d'un agitateur magnétique chauffant. Après refroidissement, filtrer sur coton et compléter à un litre avec de l'eau distillée. 2/ Diazo-réactif : Solution chlorhydrique d'acide sulfanilique (stable à 22°C) : Acide sulfanilique 0,5 g, HCl concentré 2 ml, eau dist. q.s.p. 500 ml. Le diazo-réactif se prépare extemporanément par addition de 3 mg de nitrite de Na (quelques cristaux) (1) à 20 ml de solution d'acide sulfanilique. 3/ Solution étalon de bilirubine à 200 mg/l (extemporanée). Dans une capsule, peser 20 mg de bilirubine ; les dissoudre dans 2 ml de Na OH 0,1 N ; transvaser dans une fiole jaugée de 100 ml, rincer la capsule avec de l'eau distillée. Ajouter 1 g d'acétate de Na et compléter à 100 ml à l'eau distillée.

b) Diagramme des fluides : Il est représenté sur la figure 28. On notera l'emploi facultatif d'une dilution automatique au 1/11, qui permet de couvrir le domaine de concentration de 20 à 2500 mg/litre environ. Le changement de came permet de maintenir un temps de pompage de l'échantillon de 40 s dans les deux cas, correspondant à un volume de 0,11 ml environ.

c) Mode opératoire : Les échantillons de bile de Rat, recueillis dans des godets Technicon tarés, sont pesés et analysés. Le manifold standard est utilisé pour les échantillons contenant moins de 250 mg/l de bilirubine (domaine normal de concentration). Pour les valeurs plus élevées, la dilution automatique est ajoutée (par exemple pour des expériences d'hémolyse *in vivo* avec forte bilirubine biliaire). L'enregistrement se fait sur papier semi logarithmique donnant la densité optique ; le zéro de densité optique est réglé sur les réactifs. On peut réaliser sur chaque échantillon une lecture témoin de coloration sans diazo-réactif. Nous ne le faisons pas, en raison de la faible variation entre échantillons, et du volume supplémentaire de bile consommé par cette opération. Nous avons adopté une correction moyenne d'absorption introduite dans les calculs. Les lectures en densité optique sont reportées sur une courbe d'étalonnage établie seulement périodiquement.

d) Etalonnage : Principe : Dans la technique manuelle de JENDRASSIK, les variations de densité optique (D.O) lues au spectrophotomètre sont directement

(1) La quantité de nitrite ajoutée ne doit pas être trop importante sous peine de variations dans l'intensité de la coloration.

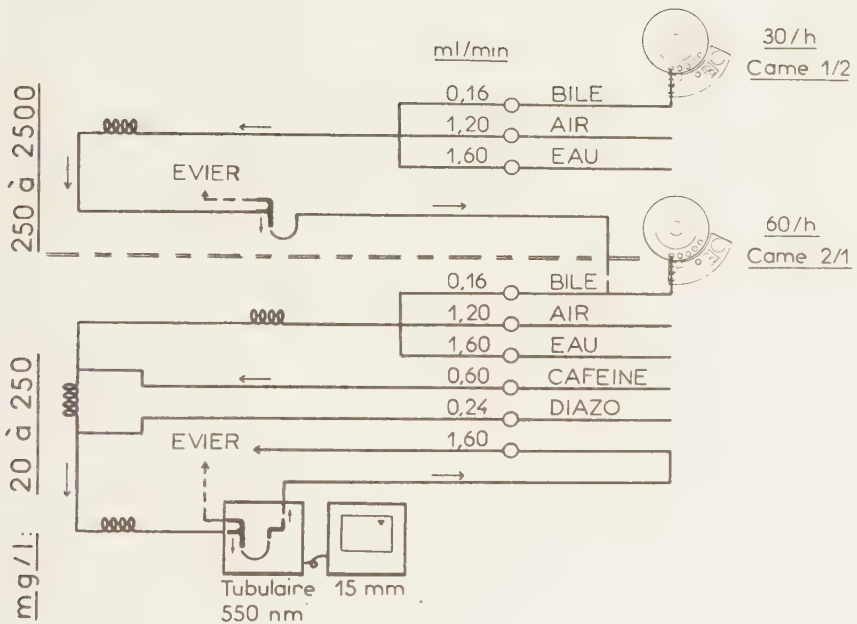


FIGURE 28: Diagramme des fluides pour le dosage de la bilirubine dans la bile à l'auto-analyseur. On note dans la partie supérieure de la figure un circuit de dilution supplémentaire, adaptable selon les besoins, qui permet d'étendre la gamme de mesure jusqu'à de très fortes concentrations (250 à 2500 mg/l), parfois rencontrées lors des études d'hémolyse *in vivo*. Lorsque ce circuit est en fonctionnement, la vitesse de passage des échantillons doit être réduite à 30 par heure.

proportionnelles aux variations de concentration de bilirubine dans la zone envisagée (soit de 0 à 150 mg/l, dans les conditions de dosage avec lecture à 550 nm de 3 à 15 mn après addition du diazo-réactif). On obtient également une droite passant par l'origine en remplaçant les solutions de bilirubine par des dilutions croissantes de bile. Avec l'auto-analyseur, l'utilisation des solutions de bilirubine n'est pas satisfaisante dans la zone de concentrations utilisées. Elle conduit à des résultats très inconstants qui semblent liés à une adhérence variable de la bilirubine aux parois en verre ou en chlorure de vinyle du circuit. Cette adhérence s'objective par une coloration jaune des tubes, réversible par lavage à NaOH N. (1) Le phénomène ne se produit pas avec la bile. Des dilutions croissantes de bile donnent des colorations dont la D.O. à 550 nm est directement proportionnelle à la concentration en bile. Avec des échantillons de bile, nous avons vérifié la constance du rapport des résultats obtenus par la technique manuelle et par l'auto-analyseur. La D.O. obtenue dans les conditions de la technique manuelle est en moyenne 1,43 fois supérieure à celle lue à l'auto-analyseur avec notre manifold actuel. Le principe de l'étalonnage est donc le suivant : 1/ effectuer parallèlement un certain nombre de dosages sur des échantillons de bile, par la technique manuelle et par la technique automatique. En déduire le rapport moyen des D.O. manuel-automatique (1,43 dans notre cas). 2/ Admettant que des solutions de bilirubine se comportent comme des échantillons de bile, tracer une droite d'étalonnage par la méthode manuelle à partir de solutions étalons de bilirubine, et la transposer pour l'auto-analyseur en utilisant le coefficient déterminé précédemment.

Absorption de base de la bile à 550 nm : Des solutions de bilirubine, n'ayant pas subi la diazo-réaction, absorbent très peu à 550 nm. Il n'en est pas de même avec la bile, qui possède une certaine absorption à cette longueur d'onde, qu'il est classique de déduire des chiffres trouvés pour le dosage. La valeur relative des témoins augmente d'ailleurs avec la durée de conservation des échantillons de bile. La pratique de la soustraction de l'absorption de base est possible à l'auto-analyseur, mais elle nécessite deux passages de l'échantillon de bile, donc une quantité de bile deux fois plus importante, c'est-à-dire un temps de recueil deux fois plus long. Pour nos expériences chez le Rat nous avons choisi le recueil plus fréquent d'échantillons moins volumineux qui permettent de mieux suivre la cholérèse malgré l'imprécision consécutive au choix d'une valeur relative moyenne pour le témoin (toutes les 30 mn, soit 200 à 300 mg de bile). Dans nos conditions actuelles de travail, la valeur relative adoptée pour le témoin des échantillons de bile est 7 p. 100. La D.O. retenue représentera donc 93 p. 100 de la D.O. mesurée.

Technique : Préparer, par dilution dans l'eau distillée de la solution mère de bilirubine à 200 mg/litre fraîchement préparée, trois concentrations de bilirubine : 50, 100 et 150 mg/litre. Avec chacune de ces solutions, effectuer une réaction de diazotation et une réaction témoin comme suit :

	Dosage	Témoin
Solution bilirubine	0,5 ml	0,5 ml
R. Caféine	1 ml	1 ml
Eau distillée	3 ml	3,5 ml
Diazo-réactif	0,5 ml	0 ml

Déterminer la D.O. à 550 nm au spectrophotomètre entre 3 et 15 mn après l'addition du diazo-réactif. Tracer la droite passant par l'origine, qui représente les variations de D.O. (différence de D.O. entre dosage et témoin) en fonction de la concentration en bilirubine. Calculer la variation de concentration en bilirubine (mg/l) par millième de D.O. soit k (par exemple : $k = 0,148$).

(1) Notons que certains auteurs pensent depuis avoir résolu ce problème en ajoutant des protéines aux solutions de bilirubine.

A partir de la valeur k , connaissant : - le rapport des D.O. obtenues à partir d'un même échantillon de bile par les deux méthodes : manuelles (M) et automatique (A) (Par exemple : $M/A = 1,43$); - et la valeur relative moyenne p. 100 du témoin de bile (t) (par exemple 7 p. 100 pour une conservation de 0 à 6 heures de la bile de Rat), déterminer la valeur K représentant la variation de concentration de bilirubine en mg/litre par millième de D.O. à l'auto-analyseur :

$$K = k \times \frac{M}{A} \times (1 - t) \text{ soit dans l'exemple choisi :}$$

$$K = 0,148 \times 1,43 \times 0,93 = 0,197.$$

Notes : 1/ La quantité de bile nécessaire pour un dosage est d'environ 0,2 ml pour un passage, 0,3 ml pour deux passages successifs. 2/ La reproductibilité, essayée sur un même échantillon de bile à l'auto-analyseur est très bonne. On a par exemple obtenu pour 10 passages successifs des D.O. variant de 0,590 à 0,610, soit un coefficient de variation de 1 p. 100. 3/ L'étalonnage décrit est long et onéreux. On ne le réalise que de temps en temps. Il est difficile de se rendre compte de déviations systématiques dans la coloration en dehors de l'étalonnage. On se contente pratiquement d'effectuer un contrôle périodique des conditions de dilution, afin de se mettre à l'abri d'un éventuel changement de débit d'une des tubulures, en pompant à la place de la bile, en même temps que le réactif, une solution colorée de bonne conservation, qui doit toujours donner la même valeur de D.O.

B) Résultats

Les résultats comportent deux sections pour chaque polymère : débit de bile (donc action sur l'excrétion biliaire de l'eau) et concentration et débit de la bilirubine (donc essentiellement étude de l'hémolyse *in vivo*). Les résultats sont groupés dans les tableaux XLII à LIII pour les polymères ; deux doses différentes au moins ont été administrées dans chaque cas. Les tableaux XLV et LIV sont consacrés à l'étude d'une série témoin ayant reçu 5 ml de ClNa à 7 p. 1000.

1.- Action sur le débit biliaire.

a) PF-68 (tableau XLII). La solution à 10 p. 100 hypo-osmotique ($\Delta t \approx 0,200^\circ \text{C}$) manifeste un franc effet hypochocholérétique, maximal de la dixième à la vingtième minute, c'est-à-dire dans les dix minutes suivant la fin de la perfusion. Cette hypochocholérèse n'est pas en rapport avec l'hypoosmose de la solution perfusée, puisque la même dose de PF-68 à 10 p. 100, isotonisée par du chlorure de sodium, donne une hypochocholérèse du même ordre durant les 20 premières minutes.

L'hypochocholérèse est suivie à partir de la trentième minute d'une phase d'hyperchocholérèse qui surcompense nettement le retard à l'excrétion précédent : le débit biliaire est encore plus élevé que chez les témoins à la troisième heure, de façon plus nette d'ailleurs avec la solution hypoosmotique qu'avec la solution isoosmotique.

En doublant la dose de PF-68, sous forme d'une solution à 25 p. 100 dans l'eau, l'effet est tout à fait comparable, sans être plus accusé que précédemment.

b) PEG 6000 (Tableau XLIII). La perfusion de PEG produit un effet tout à fait comparable à celle de PF-68 : hypochocholérèse suivie d'une hyperchocholérèse avec bilan final positif. Le décours temporel de cette double action est un peu différent selon les doses. Avec 0,50 g de PEG en solution à 10 p. 100 isotonisée au ClNa, la baisse maximale est obtenue pendant les dix premières minutes, c'est-à-dire durant la perfusion elle-même, et l'hyperchocholérèse maximale entre 20 et 30 minutes après le début de la perfusion. Avec 1 g de PEG en solution à 25 p. 100 dans l'eau, la flèche d'hypochocholérèse est également obtenue pendant la perfusion (entre 10 et 20 minutes), et la flèche d'hyperchocholérèse est observée entre

TABLEAU XLII

Variations du débit biliaire après perfusion de PF-68 (Δ débit en gttes/h. Dans chaque case: moyenne, nombre, variance).

Solution perfusée	Δ 10	Δ 20	Δ 30	Δ 40	Δ 50	Δ 60	Δ 120	Δ 180
PF-68 à 10 p. 100 dans l'eau distillée - 5 ml perfusés en 11 mn. $\Delta t = - 0,196^{\circ} \text{C}$	- 10,1 13 21,6	- 18,4 13 73,4	7,9 13 210,6	13,7 13 88,2	18,2 13 51,8	16,8 13 84,6	14,3 13 52,8	5,3 12 60,3
PF-68 à 10 p. 100 + ClNa 0,59 p. 100 - 5 ml perfusés en 11 mn. $\Delta t = - 0,56^{\circ} \text{C}$.	- 4,8 11 41,8	- 14,7 11 87,1	14,2 11 304,2	15,0 11 64,8	15,2 11 85,3	9,0 11 43,2	5,9 11 16,9	- 1,0 9 26,8
PF-68 à 25 p. 100 4 ml perfusés en 25 mn	- 4,5 10 22,3	- 12,3 10 218,9	- 7,2 10 120,2	3,6 10 199,4	4,1 10 124,6	9,9 10 216,0	7,2 8 82,9	4,2 8 44,3

TABLEAU XLIII

Variations du débit biliaire après perfusions de PEG 6000 (Δ Débits en gttes/h. Dans chaque case : moyenne, nombre, variance).

Solutions perfusées	Δ 10	Δ 20	Δ 30	Δ 40	Δ 50	Δ 60	Δ 120	Δ 180
PEG 6000 à 10 p. 100 dans l'eau, isotonisé par ClNa 5,6 g/l - 5ml perfusés en 11 mn	- 11,7 10 74,9	- 2,7 10 90,7	21,3 10 48,6	9,7 9 80,3	7,3 9 60,8	3,7 9 44,3	4,6 9 14,0	- 0,5 9 27,2
PEG 6000 à 25 p. 100 dans OH ₂ - 4 ml perfusés en 25 mn	- 6,6 9 21,9	- 11,6 9 86,4	6,7 8 50,8	24,4 8 34,6	15,0 8 41,0	6,0 9 18,0	- 1,2 9 41,0	- 4,0 9 55,0

30 et 40 minutes. Il faut cependant observer que les vitesses de perfusion sont différentes pour les deux doses : 11 minutes pour la faible dose et 25 minutes pour la forte, de manière à éviter un apport trop massif de solution très concentrée. En tenant compte de ce fait on observe que dans les deux cas l'hypocholeurèse est maximale pendant la perfusion, et l'hypercholeurèse maximale 15 à 20 minutes après la fin de celle-ci.

c) PVP 11.000 (Tableau XLIV). La PVP produit sur la choleurèse un effet différent des deux produits précédents, en donnant une hypercholeurèse immédiate dès le début de la perfusion, se prolongeant jusqu'à la troisième heure, et sans phase d'hypocholeurèse. La quantité totale de bile éliminée en trois heures au-dessus du niveau de base est de 25,8 gouttes pour la dose de 0,50 g en solution à 10 p. 100 isotonisée, et de 52,3 gouttes pour la dose de 1 g en solution aqueuse pure. On note donc une bonne proportionnalité entre la réponse choleurétique et la dose injectée, contrairement à ce qui se passait précédemment pour les deux autres produits.

2.— Action sur l'excrétion de la bilirubine

a) PF-68 (Tableaux XLVI - XLVIII). Concentration et débit de bilirubine sont notablement augmentés après perfusion de la solution à 10 p. 100 dans l'eau, avec une flèche de concentration de 90 mg/l environ en variation positive. A titre de comparaison, le tableau XLIX donne les variations observées après injection intraveineuse de 2 ml d'eau distillée à une série de rats. On voit ainsi que l'hémolyse produite par 5 ml de PF-68 10 p. 100 est beaucoup plus faible que celle que donnent 2 ml d'eau.

La solution à 10 p. 100 isotonisée par ClNa donne une légère tendance à l'augmentation de la concentration et du débit, mais cette augmentation est non significative pour la concentration et significative seulement au bout de 1 h30 pour le débit, c'est-à-dire pendant une phase de légère hypercholeurèse par rapport aux données des rats témoins du tableau XLV. Après la forte dose (1 g en solution à 25 p. 100), les variations sont également nulles (Tableau XLVIII), si on excepte une légère diminution du débit pendant la phase d'hypocholeurèse initiale.

b) PEG 6.000 (Tableaux L - LI). La solution à 10 p. 100 isotonisée par ClNa ne produit absolument aucune variation du taux de bilirubine biliaire. Après la forte dose de solution à 25 p. 100, il en va sensiblement de même, la légère tendance à l'augmentation restant non significative pendant les trois heures de l'étude.

c) PVP 11.000 (Tableaux LII - LIII). La concentration de bilirubine baisse avec la faible dose, la baisse maximale étant observée entre 30 et 60 minutes, ce qui (compte tenu des différences dans les intervalles de mesure) coïncide sensiblement avec la période d'hypercholeurèse maximale. Le débit de bilirubine lui-même est sensiblement inchangé, ce qui indique que l'hypercholeurèse est uniquement due à une excrétion supplémentaire d'eau (peut-être entraînée par la PVP dissoute, ce que nous n'avons pas vérifié) avec même léger recul de l'excrétion bilirubinique normale et donc sans hémolyse.

La forte dose produit une diminution moins durable de la concentration de bilirubine, malgré une hypercholeurèse plus élevée, ce qui indique que la solution aqueuse à 25 p. 100 pourrait produire une très légère hémolyse, cependant très faible et non établie avec certitude puisqu'il peut s'agir d'un léger excès d'excrétion de bilirubine normale sous l'influence de la forte hypercholeurèse.

D) Discussion

1.— Action sur le débit biliaire.

Les polymères montrent deux actions distinctes : hypocholeurèse suivie d'hypercholeurèse, reliées plus à la concentration sanguine qu'à la dose pour PEG et

TABLEAU XLIV

Variations du débit biliaire après perfusions de PVP 11.000

(Δ débits en gttes/h ; dans chaque case : moyenne, nombre, variance).

Solution perfusée	Δ 10	Δ 20	Δ 30	Δ 40	Δ 50	Δ 60	Δ 120	Δ 180
PVP 11.000 à 10 p. 100 dans l'eau, isotonisée par ClNa 6g/l 5 ml perfusés en 11 mn	2,1 10 108,0	20,4 10 311,4	34,5 10 376,2	21,9 10 119,9	16,2 10 36,4	17,4 10 367,6	6,0 10 47,8	1,1 9 22,2
PVP 11.000 à 25 p. 100 dans l'eau distillée 4 ml perfusés en 25 mn	2,7 10 18,7	23,4 10 57,6	46,8 10 76,3	60,9 10 266,0	45,0 10 162,0	31,8 10 98,3	14,5 10 150,5	2,7 10 83,6

TABLEAU XLV

Action sur le débit biliaire de 5 ml de soluté de ClNa à 7 p. 1000,
perfusés en 9 minutes

Temps en minutes	Δ 10	Δ 20	Δ 30	Δ 40	Δ 50	Δ 60	Δ 120	Δ 180
Variation moyenne du débit biliaire (gouttes/heure)	- 0,8	1,0	2,5	2,2	0,4	1,6	0,3	- 1,9
Nombre	10	10	10	10	10	10	10	10
Variance	12,0	28,4	42,8	36,0	48,2	75,6	35,3	41,4

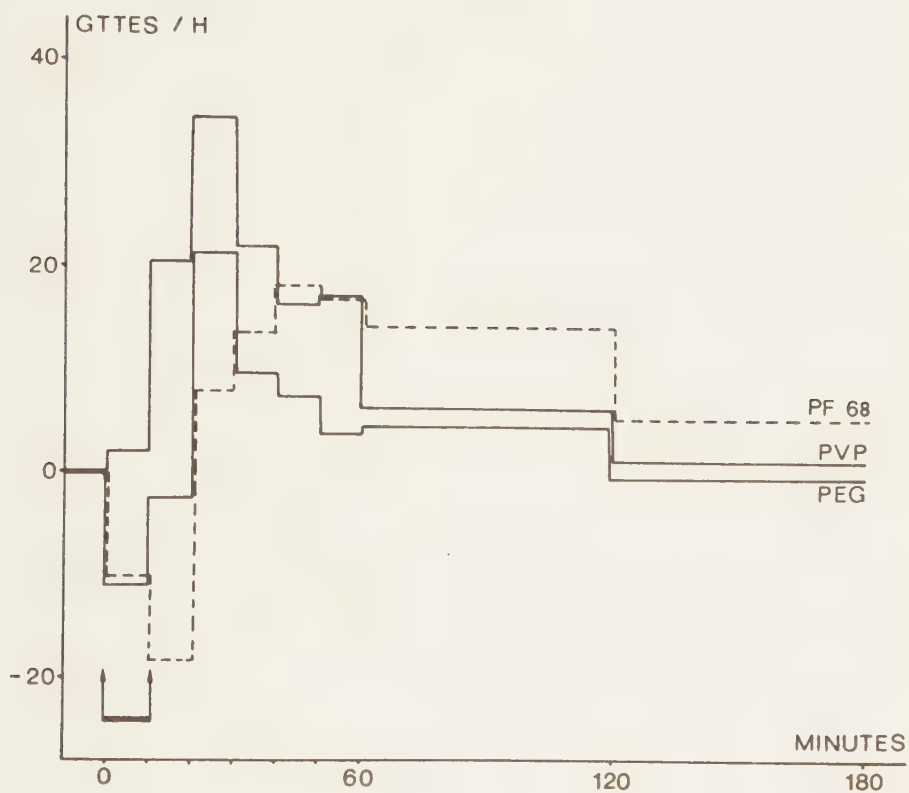


FIGURE 29: Variations du débit biliaire chez le Rat après perfusion de 5ml de solutions des polymères à 10% (entre les flèches). La variation du débit est exprimée en différences par rapport au niveau de base mesuré avant le début de la perfusion. (Le débit biliaire absolu est de l'ordre de 55 à 60 gttes / h dans nos conditions).

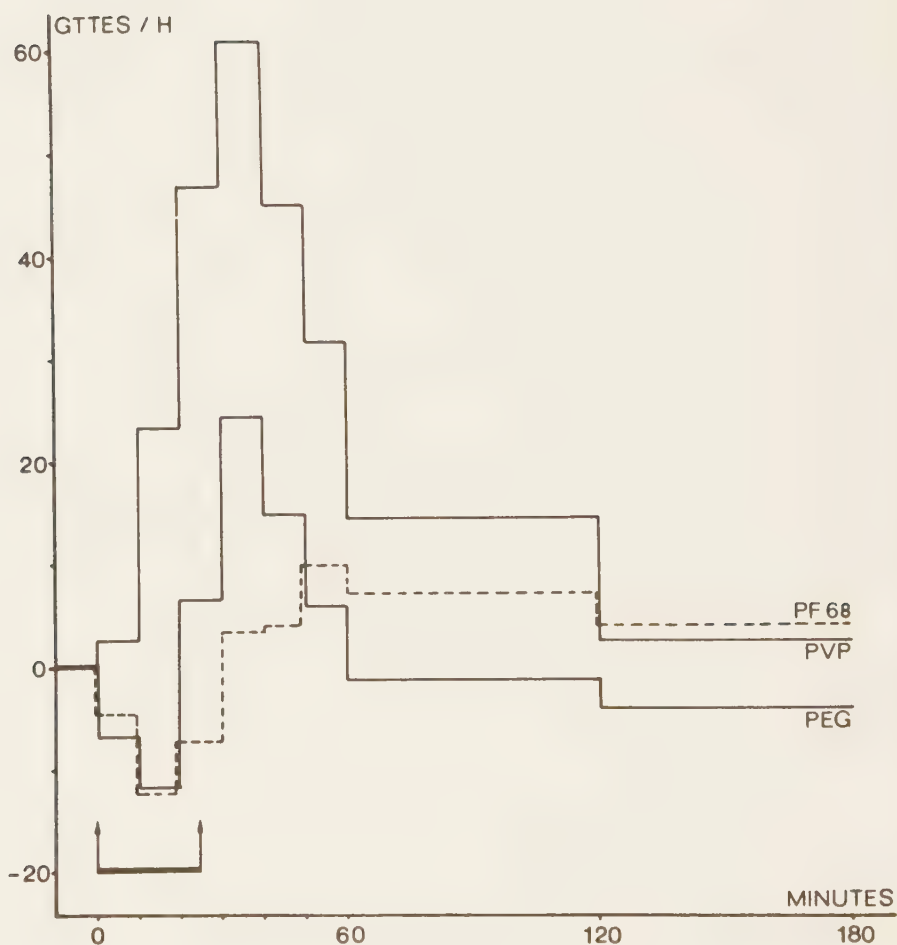


FIGURE 30: Variations du débit biliaire chez le Rat après perfusion de 4 ml de solutions des polymères à 25% (entre les flèches). La variation du débit est exprimée en différences par rapport au niveau de base mesuré avant le début de la perfusion. (Le débit biliaire absolu est de l'ordre de 55 à 60 gttes/h dans nos conditions).

TABLEAU XLVI

Variations de la concentration et du débit de la bilirubine après perfusion de 5 ml PF-68 à 10 pour 100 dans l'eau.

Variations de la concentration de bilirubine (mg/l)	Temps (mn)	Moyenne	Nombre	Variance	P (1)
	Δ 30	- 0,9	11	74	NS
	Δ 60	37	12	198	0,001
	Δ 90	63,9	12	836	0,001
	Δ 120	91	12	1834	0,001
	Δ 150	88	11	1663	0,001
	Δ 180	82	11	1186	0,001
Variations du débit de bilirubine (μg/mn)	Δ 30	- 0,144	11	0,0905	NS
	Δ 60	0,563	12	0,0403	0,001
	Δ 90	1,045	12	0,2683	0,001
	Δ 120	0,950	11	0,1314	0,001
	Δ 150	0,797	11	0,1234	0,001
	Δ 180	0,705	11	0,0929	0,001

(1) P : Seuil de confiance de la différence avec les chiffres relevés dans un lot de rats témoins.

TABLEAU XLVII

Variations de la concentration et du débit de la bilirubine après perfusion de 5 ml de PF-68 à 10 p. 100 isotonisé par ClNa.

Variations de la concentration de bilirubine (mg/l)	Temps (mn)	Moyenne	Nombre	Variance	P
	Δ 30	7,6	9	212	NS
	Δ 60	12,3	11	381	NS
	Δ 90	17,4	11	562	NS
	Δ 120	18,8	11	637	NS
	Δ 150	24,5	9	411	NS
	Δ 180	29,8	9	332	NS
Variations du débit de bilirubine ($\mu\text{g}/\text{mn}$)	Δ 30	0,08	9	0,0218	NS
	Δ 60	0,21	11	0,0877	NS
	Δ 90	0,30	11	0,0358	0,01
	Δ 120	0,22	11	0,0382	NS
	Δ 150	0,23	9	0,0234	NS
	Δ 180	0,41	9	0,1301	NS

TABLEAU XLVIII

Variations de la concentration et du débit de la bilirubine biliaire après perfusion de 4 ml de PF-68 à 25 p. 100 dans l'eau distillée.

	Temps (mn)	Moyenne	Nombre	Variance	P
Variation de la concentration de bilirubine (mg/l)	Δ 30	2,5	10	79	NS
	Δ 60	10,7	10	426	NS
	Δ 90	5,0	9	313	NS
	Δ 120	16,5	10	1402	NS
	Δ 150	16,5	10	757	NS
	Δ 180	22,7	9	1000	NS
Variation du débit de bilirubine ($\mu\text{g}/\text{mn}$)	Δ 30	- 0,119	10	0,0517	0,05
	Δ 60	0,158	10	0,1169	NS
	Δ 90	0,102	9	0,0866	NS
	Δ 120	0,130	10	0,1527	NS
	Δ 150	0,165	10	0,1154	NS
	Δ 180	0,160	9	0,1108	NS

TABLEAU XLIX

ACTION D'UNE INJECTION INTRAVEINEUSE DE 2 ml D'EAU DISTILLÉE SUR LA CONCENTRATION ET LE DÉBIT DE

BILIRUBINE DANS LA BILE CHEZ LE RAT.

Temps après l'injection en min	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180
Variation de la concentration de la bilirubine biliaire (mg/l ; différences par rapport à la valeur mesurée avant l'injection).												
Moyenne	- 28	- 3	69	195	250	269	322	338	321	302	285	269
Nombre	7	8	8	8	8	8	8	7	8	7	7	7
Variance	1.400	1.193	9.752	5.621	6.279	7.483	7.762	4.062	5.423	886	11132	7.396
Moyenne	-0,18	-0,05	0,93	1,86	2,32	2,85	2,74	2,91	2,91	2,66	2,65	2,53
Nombre	8	7	8	8	8	8	8	8	8	8	7	7
Variance	0,0756	0,034	0,5605	0,6048	0,5862	0,4132	0,4173	0,6043	0,4013	0,7766	0,4493	0,4675

TABLEAU L

Variations de la concentration et du débit de la bilirubine après perfusion de 5 ml de PEG 6.000 à 10 p. 100, isotonisé par ClNa.

	Temps (mn)	Moyenne	Nombre	Variance	P
Variations de la concentration de bilirubine (mg/l)	Δ 30	- 3,0	10	160	NS
	Δ 60	- 15,6	10	533	NS
	Δ 90	- 15,8	10	836	NS
	Δ 120	- 15,4	10	1038	NS
	Δ 150	- 9,3	10	1126	NS
	Δ 180	- 2,8	10	1181	NS
Variations du débit de bilirubine (μ g/mn)	Δ 30	0,004	10	0,0221	NS
	Δ 60	- 0,015	10	0,0538	NS
	Δ 90	- 0,056	10	0,0503	NS
	Δ 120	- 0,089	10	0,0949	NS
	Δ 150	- 0,083	10	0,0894	NS
	Δ 180	- 0,003	10	0,0980	NS

TABLEAU LI

Variations de la concentration et du débit de la bilirubine biliaire après perfusion de 4 ml de PEG 6000 à 25 p. 100 dans l'eau distillée.

Variations de la concentration de bilirubine (mg/l)	Temps (mn)	Moyenne	Nombre	Variance	P
	Δ 30	6,1	10	70	NS
	Δ 60	3,0	10	195	NS
	Δ 90	6,8	10	216	NS
	Δ 120	11,6	10	208	NS
	Δ 150	20,0	10	416	NS
	Δ 180	23,5	10	610	NS
Variations du débit de bili- rubine (μ g/mn)	Δ 30	- 0,061	9	0,0725	NS
	Δ 60	0,121	9	0,1218	NS
	Δ 90	0,101	9	0,0143	NS
	Δ 120	0,055	9	0,0185	NS
	Δ 150	0,111	9	0,0477	NS
	Δ 180	0,124	9	0,0234	NS

TABLEAU LII

Variation de la concentration et du débit de la bilirubine après perfusion de 5 ml de PVP 11.000 à 10 pour 100, isotonisé par ClNa.

Variations de la concentration de bilirubine (mg/l)	Temps (mn)	Moyenne	Nombre	Variance	P
	Δ 30	— 19,3	10	294	0,05
	Δ 60	— 44,1	10	463	0,001
	Δ 90	— 30,4	10	623	0,05
	Δ 120	— 23,7	10	700	0,05
	Δ 150	— 12,6	10	793	NS
	Δ 180	0,9	9	1059	NS
Variations du débit de bilirubine ($\mu\text{g}/\text{mn}$)	Δ 30	0,224	10	0,1224	NS
	Δ 60	— 0,073	10	0,0113	NS
	Δ 90	— 0,093	10	0,0191	NS
	Δ 120	— 0,153	10	0,0414	NS
	Δ 150	— 0,183	10	0,1220	NS
	Δ 180	0,025	9	0,0324	NS

TABLEAU LIII

Variation de la concentration et du débit de la bilirubine biliaire après perfusion de 4 ml de PVP 11000 à 25 p. 100 dans l'eau distillée.

Variations de la concentration de bilirubine (mg/l)	Temps (mn)	Moyenne	Nombre	Variance	P
	Δ 30	— 10,5	10	84	0,01
	Δ 60	— 35,9	10	176	0,001
	Δ 90	— 18,7	10	384	NS
	Δ 120	— 6,6	10	521	NS
	Δ 150	5,7	10	742	NS
	Δ 180	19,0	10	1154	NS
Variations du débit de bilirubine (μg/mn)	Δ 30	0,245	10	0,0136	0,001
	Δ 60	0,118	10	0,0314	NS
	Δ 90	0,029	10	0,0409	NS
	Δ 120	0,074	10	0,0465	NS
	Δ 150	0,126	10	0,0672	NS
	Δ 180	0,167	10	0,0721	NS

TABLEAU LIV

Variations de la concentration et du débit de la bilirubine biliaire après perfusion de 5 ml de ClNa à 7 p. 1000 (temps de perfusion 9 minutes).

Variations de la concentration de bilirubine (mg/l)	Temps (mn)	Moyenne	Nombre	Variance
	Δ 30	4,1	10	175
	Δ 60	0,6	10	434
	Δ 90	2,3	10	758
	Δ 120	5,4	10	116
	Δ 150	9,1	10	1477
	Δ 180	12,7	10	1655
Variations du débit de bilirubine (μ g/mn)	Δ 30	0,049	10	0,0087
	Δ 60	0,009	10	0,0293
	Δ 90	0,012	10	0,0513
	Δ 120	0,026	10	0,1129
	Δ 150	0,041	10	0,1234
	Δ 180	0,073	10	0,1502

PF-68 ; hypercholérèse immédiate reliée à la dose pour la PVP. Il semble logique de considérer que ces deux actions, de cinétique différente, ont des mécanismes différents. Avant d'émettre des hypothèses sur ces mécanismes, nous rappellerons quelques notions sur les mécanismes de la sécrétion biliaire.

a) Rappel des mécanismes de la sécrétion biliaire. Alors que les mécanismes de la formation de l'urine sont en grande partie connus, un grand nombre d'incertitudes subsistent encore au sujet de la formation de la bile. La question a été bien résumée par ERLINGER (1968).

. α Rappel anatomique : L'arbre biliaire comprend successivement les canalicules, les ductules, les canaux intra-hépatiques, le canal hépatique, éventuellement la vésicule et le canal cystique, enfin le cholédoque. La lumière canaliculaire peut en première approximation être considérée comme un compartiment unique séparé du cytoplasme des hépatocytes uniquement par la membrane cellulaire. A la suite des canalicules se place une grande longueur de canaux hépatiques. Ces formations sont toutes bordées par un épithélium propre, et la longueur totale de l'arbre biliaire ainsi constitué est très grande (chez l'Homme elle a été estimée à environ deux kilomètres). La surface offerte aux échanges est considérable, augmentée encore par la présence de micro-villosités. Dans les cellules épithéliales des ductules on a décrit l'appareil de Golgi, la membrane basale ; on y a observé des phénomènes de pinocytose. Différents arguments laissent penser que les voies biliaires ne sont pas un conduit inerte ; une participation active de ces conduits dans l'élaboration de la bile est vraisemblable.

. β Composition de la bile : Les constituants biliaires peuvent être classés en trois catégories : 1/ Substances dont la concentration biliaire est très voisine de la concentration plasmatique : sodium, potassium, chlore, glucose ; 2/ Substances dont la concentration biliaire est nettement supérieure à la concentration plasmatique : sels biliaires, pigments biliaires, colorants ; 3/ Substances dont la concentration biliaire est inférieure à la concentration plasmatique : saccharose, inuline, phosphatase alcaline, protéines.

Les sels biliaires sont présents dans la bile sous forme de micelles contenant vraisemblablement de la lécithine et du cholestérol, et ayant fixé des ions calcium et sodium. Les pigments biliaires pourraient éventuellement faire partie de ces micelles, qui, chargées négativement, sont associés à des cations. Ces micelles étant grosses, la pression osmotique d'une solution de sels biliaires est anormalement basse. Ceci implique qu'une bile très concentrée, comme la bile vésiculaire, peut être obtenue au prix d'un travail osmotique réduit, et qu'elle reste iso-osmotique au plasma ; ensuite, si une molécule apparaît dans la bile à forte concentration et ne participe pas à la formation des micelles, elle peut augmenter considérablement la pression osmotique de la bile.

. γ Fonctions des hépatocytes dans la cholérèse : a) La formation de la bile n'est pas une filtration hydrostatique. En effet : 1/ La bile peut être sécrétée par un foie isolé à des pressions considérablement supérieures à la pression sinusoidale ; 2/ Si l'on relie un cathéter placé dans le cholédoque à un manomètre vertical, la bile s'élève progressivement dans le manomètre pour se stabiliser à une certaine pression ; cette pression biliaire maximale est toujours notablement supérieure à la pression sinusoidale ; 3/ L'espace sanguin sinusoidal est toujours séparé de l'espace biliaire canaliculaire par au moins l'épaisseur d'une demi-cellule hépatique.

b) Les sels biliaires sont sécrétés activement par les hépatocytes. L'énergie nécessaire à la formation de la bile vient nécessairement d'un processus intra-hépatique. SPERBER a émis l'hypothèse que cette énergie était fournie par la sécrétion des sels biliaires par les hépatocytes. Depuis, un certain nombre de faits ont confirmé que les sels biliaires sont activement sécrétés par la cellule hépatique, et

que leur sécrétion entraîne une cholérèse proportionnelle à leur taux d'excrétion dans la bile. Les arguments en faveur d'un tel transport actif sont les suivants :

- 1/ Le transport des sels biliaires se fait contre un gradient de concentration considérable. La concentration dans la bile hépatique humaine est d'environ 5 millimoles par litre, alors que la concentration sanguine est d'environ 0,002 millimoles par litre, soit un rapport de l'ordre de 2.500. — 2/ Lors de perfusions de sels biliaires à des taux croissants, une saturation du transport biliaire peut être mise en évidence, ce qui est caractéristique des transports actifs (existence d'un T_m). 3/ Une compétition entre les sels biliaires et d'autres anions organiques est observée dans certaines conditions. Ces anions organiques sont sans doute transportés par le même mécanisme que le sel biliaire. Cependant, les anions organiques ne sont pas les seuls à être transportés activement de l'hépatocyte vers la bile. Notamment, les cations ont un transport actif indépendant de celui des anions ; d'autre part, le mécanisme de transport des anions organiques lui-même n'est sans doute pas unique. Dans des conditions convenables, la B.S.P. n'entre pas en concurrence avec l'élimination des sels biliaires. — 4/ La sécrétion des sels biliaires est sensible aux inhibiteurs métaboliques, à l'anoxie et à l'hypothermie.

Le mécanisme par lequel les sels biliaires provoquent la cholérèse est vraisemblablement de nature osmotique. L'introduction dans la lumière canaliculaire d'un ion peu diffusible créerait un gradient osmotique favorable à la diffusion facile de l'eau et des électrolytes inorganiques. Cette hypothèse, si elle correspond à la réalité, implique que les voies biliaires soient totalement ou en grande partie imperméables aux grosses molécules. La faible concentration biliaire du saccharose et les concentrations très basses de molécules encore plus grosses comme l'inuline ou les protéines sont en faveur de cette hypothèse. CHENDEROVITCH (1961) a montré que la P.V.P. 40.000 n'apparaissait pas dans la bile chez le Cobaye.

Il s'agit bien d'un mécanisme osmotique car d'autres anions organiques (rouge de phénol, fluorescéine, B.S.P., polyéthylène-glycol ; SPERBER, 1965), jouissent de la même propriété. L'activité cholérétique est grossièrement proportionnelle au pouvoir osmotique ; la réduction du gradient osmotique par injection intraveineuse de soluté hypertonique diminue le débit biliaire et l'excrétion des électrolytes sans modifier de façon significative le taux d'excrétion des sels biliaires et de la bilirubine (CHENDEROVITCH, 1963).

Cependant, dans certains cas, une sécrétion active d'ions inorganiques, indépendamment des sels biliaires est également possible. Ainsi, le débit biliaire peut être relativement élevé dans le foie isolé de Rat perfusé avec des solutions ne contenant pas de sels biliaires (BRAUER, PESSOTI, FIZZOLATO, 1951).

.8 Fonction des voies biliaires dans la cholérèse : La bile canaliculaire peut être modifiée dans les voies biliaires par deux types de phénomènes : des phénomènes de réabsorption et des phénomènes de sécrétion :

- 1/ Les phénomènes de réabsorption ont lieu d'une part dans la vésicule biliaire, ce qui nous intéresse peu ici, d'autre part probablement dans la voie biliaire principale. Le processus primitif de réabsorption semble être le transport actif dans le sens muqueuse-séreuse d'une solution isotonique de chlorure de sodium et peut-être de bicarbonate. L'eau suit passivement les mouvements des électrolytes. Il est à noter que le transport actif de l'électrolyte à travers la vésicule biliaire ne s'accompagne pas d'une différence de potentiel transmembranaire. Il faut donc postuler l'existence d'un mécanisme électriquement neutre transportant à la fois obligatoirement le chlore et le sodium. Cette pompe électriquement neutre se retrouve dans toutes les espèces étudiées : Lapin, Poisson, Chat, Chien. TORMEY et DIAMOND (1967) pensent avoir mis en évidence chez le Lapin un système de canaux intercellulaires longs et étroits, fermés en surface, situés entre les cellules du revêtement épithélial, qui transporterait une solution de ClNa . La voie biliaire prin-

cipale a sans doute également un rôle de réabsorption. Par exemple, chez le Rat, le mannitol est toujours légèrement plus concentré dans la bile que dans le sang. Si l'on admet qu'il entre passivement dans la bile, cela suggère une réabsorption d'eau par une partie de l'arbre biliaire relativement moins perméable au mannitol que les hépatocytes.

2/ La possibilité de phénomènes sécrétoires dans les voies biliaires a été évoquée dès 1921 par ROUX et MAC MASTER. Mais ce n'est qu'assez récemment que des arguments expérimentaux ont pu être groupés en faveur de cette hypothèse.

— La secrétine augmente le débit biliaire ⁽¹⁾ sans augmenter le débit des sels biliaires. Par contre, les électrolytes sont sécrétés en plus grande quantité. Ces faits ont conduit à supposer que la bile obtenue après secrétine résultait du mélange de deux liquides : l'un sécrété sous l'influence des sels biliaires (fraction cholalo-dépendante), l'autre, riche en bicarbonate et en chlore, sécrété sous l'influence de la secrétine, indépendamment des sels biliaires (fraction cholalo-indépendante). Plusieurs arguments indiquent que la fraction cholalo-indépendante due à la secrétine est formée non par des hépatocytes, mais par les voies biliaires (WHEELER et MANCUSI-UNGARO, 1966).

— Sous perfusion constante de sels biliaires, le débit biliaire subit d'importantes fluctuations. Ces fluctuations pourraient être dues à l'addition de la fraction cholalo-indépendante, due aux voies biliaires. Cette fraction cholalo-indépendante pourrait éventuellement être due à la secrétine endogène.

— La stimulation du bout périphérique du pneumo-gastrique, qui augmente le débit biliaire (TANTURI et IVY, 1938), produit une hydrocholérèse. Cet effet peut être dû à une action sur les voies biliaires plutôt qu'à une stimulation directe des hépatocytes.

— Lors de l'augmentation de la pression veineuse sus-hépatique, le débit biliaire diminue. Dans cette condition, la fraction cholalo-dépendante est diminuée de façon marquée, alors que la réponse cholérétique à la secrétine est maintenue.

— La gastrine augmente le débit biliaire chez le Chien gastrectomisé. Ses effets sont très proches de ceux de la secrétine et il est tentant de les attribuer au même mécanisme.

— Lors de l'obstruction biliaire, la composition de la bile est modifiée : les concentrations en bicarbonate et en chlore augmentent, tandis que la concentration du taurocholate diminue. La mesure de la concentration en chlore d'échantillons successifs de bile libérée après la fin du recueil sous pression suggère que la fraction cholalo-indépendante entre dans les voies biliaires à des sites distaux par rapport aux canalicules grâce à des mécanismes sécrétoires situés dans les ductules ou les canaux biliaires (ERLINGER, 1968, données obtenues chez le Chien).

Dans des expériences effectuées chez le Rat anesthésié (DEBRAY, BESANCON, ROZE, 1961), l'obstruction biliaire partielle réalisée par élévation de l'orifice libre d'un cathéter cholédocien ralentit dans les mêmes proportions l'excrétion de la B.S.P. et l'élimination de la bile. Au contraire, l'élimination de la bilirubine n'est pas ralentie et même elle dépasse le niveau basal après la deuxième heure, par suite d'une forte augmentation de la concentration. L'excrétion préférentielle de la bilirubine par rapport à la B.S.P. est observée encore plus nettement quand, à l'obstruction biliaire partielle, s'ajoute l'effet hydrocholérétique du déhydrocholate de sodium. Nous n'avons pas trouvé chez le Rat la diminution de concentration des sels biliaires (dosés par la réaction phospho-vanillique) signalée par ERLINGER (1968) chez le Chien au cours de l'obstruction partielle (BESANCON, ROZE et Coll., 1967).

(1) Chez le Rat une secrétine très pure semble dépourvue d'une telle action (DEBRAY et Coll., 1962 b). Par contre, la pancréozy mine est cholérétique, de même qu'un extrait de vésicule biliaire (voir : ROZE, 1964 b).

b) Hypothèses concernant le mode d'action des polymères. Diverses éventualités peuvent être envisagées :

1/ Pendant la perfusion, le polymère pourrait inhiber la sécrétion distale d'eau dans les voies biliaires. CHENDEROVITCH (1966) a observé à ce niveau une dilution biliaire de l'ordre de 30 à 40 p. 100 chez le Lapin à vésicule exclue, avec une technique telle que la longueur du colédoque fonctionnel soit plus importante que dans notre technique de fistulisation chez le Rat. Ces mouvements de l'eau étant consécutifs à un transfert vraisemblablement actif de sodium, l'effet initial pourrait être une inhibition passagère de ce transfert actif de sodium.

2/ Au niveau des hépatocytes, le polymère pourrait inhiber momentanément le passage de l'eau vers le canal, par un effet proprement osmotique. Cependant, des arguments contradictoires apparaissent. CHENDEROVITCH (1963) a montré qu'une solution hypertonique de mannitol ou de xylose diminuait la sécrétion biliaire chez le Cobaye. Ces substances, non métabolisables n'interviennent pas dans les processus sécrétoires énergétiques du foie. Avec 2 ml de solution à 1,66 M (soit environ 5,5 fois plus concentrées que des solutions iso-osmotiques), cet auteur a observé une réduction importante et durable de la cholérèse (-37,5 p. 100 en moyenne lorsque les uretères sont ligaturés). En même temps, les concentrations des électrolytes ne sont pas modifiées (leur débit est donc diminué), tandis que la bilirubine et les sels biliaires ont une concentration augmentée et un débit inchangé.

Or, nous obtenons sensiblement la même hypocholérèse avec le PF-68 lorsqu'il est perfusé en solution à $\Delta t = -0,20^{\circ} \text{C}$ et en solution à $\Delta t = -0,56^{\circ} \text{C}$. Par ailleurs, la PVP ne donne pas d'hypocholérèse et une injection de 2 ml d'eau distillée ne produit pas non plus de variation du débit biliaire.

Si on admet une traversée hépatocyttaire des polymères (ce qui n'a pas été recherché jusqu'à présent) on peut envisager une traversée immédiate pour la PVP avec entraînement d'eau vers la bile (chez le Cobaye, la PVP 40.000 ne passe pas, alors que l'inuline (P.M. : 6.000) passe ; CHENDEROVITCH, 1961), et une traversée lente pour PF-68 et PEG, entraînant un trouble de la sécrétion normale tant que la concentration de ces molécules n'a pas été égalisée sur les deux pôles de l'hépatocyte.

Notons que chez l'Homme, le PEG 6000 semble peu éliminé par la bile, puisque 96 p. 100 de la dose injectée sont retrouvés dans l'urine après 12 h. (SHAFFER et CRITCHFIELD, 1947).

Pour SPERBER (1963), le PEG 1500 est légèrement cholérétique chez le Rat et la Chèvre. Il l'est davantage chez le Poulet et le Canard. Chez ces deux espèces, la concentration biliaire de PEG obtenue est plus faible qu'avec d'autres cholérétiques, ce qui indique qu'il entraîne davantage d'eau que ne le laisse supposer son poids moléculaire. Ceci est en accord avec les résultats cryoscopiques de COUPER et ELEY (1948) et avec les nôtres sur le PEG 6000.

3/ La non proportionnalité entre la dose injectée et la réponse incite à penser pour PF-68 et PEG 6000 à un phénomène relié davantage à la concentration sanguine de substance qu'à la quantité absolue transférée. Cette constatation s'accorde avec un effet osmotique ou para-osmotique de blocage de l'eau sur la face capillaire des hépatocytes.

Au contraire, l'hypercholérèse immédiate par PVP, proportionnelle à la dose, s'accorde avec une sécrétion biliaire du produit entraînant l'eau, comme par exemple une cholérèse au déhydrocholate. Nous avons montré chez le Rat avec ce produit que la réponse cholérétique est proportionnelle à la quantité absolue de déhydrocholate injectée, quel que soit le poids de l'animal (VAILLE, ROZE, SOUCHARD, 1964).

4/ L'injection d'un soluté hypertonique de CINA produit chez le Rat une chute brève et marquée de la pression artérielle systémique (CARLINI, 1964).

Cette solution contracte les vaisseaux des membres et l'aorte, n'hémolyse pas le sang *in vivo* et a un effet direct sur le cœur (pour BRAUN, 1966, il n'y a pas d'action sur le cœur de Chien). Cependant, cette solution est très fortement hypertonique (20 p. 100 de ClNa, soit environ 28 fois l'isotonie), et par ailleurs il est généralement admis que la pression sanguine et la vitesse de circulation hépatique n'ont que peu d'influence sur le débit biliaire (CHENDEROVITCH, 1963). L'intervention d'une telle hypotension est donc très peu vraisemblable dans nos conditions, d'autant que le volume injecté n'est pas négligeable (5 ml soit 1/4 à 1/3 du volume sanguin) et entraîne sans doute une tendance à l'hypertension.

Des expériences ultérieures seront nécessaires pour trancher entre ces hypothèses, et en particulier : étude de l'élimination biliaire des polymères ; étude de l'action en cholérèse à débit bloqué, ou au moins à débit réduit, qui favorise la sécrétion distale par rapport à la sécrétion proximale hépatique.

2.— Excrétion de la bilirubine.

La concentration et le débit de la bilirubine biliaire renseignent sur la destruction globulaire immédiate produite par hémolyse. Les globules altérés sont pris en charge par les cellules du S.R.E. splénique et hépatique. L'hémoglobine, en présence d'acide ascorbique, donnerait naissance à un complexe pigment biliaire-fer-globine, la choleglobine. Le noyau tétrapyrrolique s'ouvre alors qu'il est encore lié à la globine. Il se formerait dans les cellules du S.R.E. d'abord de la biliverdine, réduite rapidement en bilirubine par la lactico-déshydrogénase. La bilirubine libre libérée dans le plasma, maintenue en solution par formation d'un complexe albumine-bilirubine libre, est glycuco-conjugée par l'hépatocyte et excrétée dans la bile (80 p. 100 sous forme conjugée) (voir : MOENS, 1965).

Nous avons montré que la destruction d'hématies par injection de solutés hypotoniques s'accompagne d'une élévation immédiate de la bilirubine biliaire dont le maximum est atteint en 2 à 3 heures (DEBRAY et Coll., 1967 b). Il est évidemment possible que des hématies altérées mais non détruites soient séquestrées dans le S.R.E. et progressivement métabolisées ultérieurement.

Quoi qu'il en soit, les résultats obtenus *in vivo* par perfusion de polymères, confirment entièrement les notions acquises *in vitro* : à la concentration 10 p. 100 dans l'eau, PF-68 entraîne une légère hémolyse *in vivo* ; *in vitro*, cette hémolyse est de l'ordre de 15 p. 100 en 30 minutes à 37° C (Tableau VIII). Le Δt d'une telle solution est de $-0,20^{\circ}$ C environ. Une hémolyse *in vivo* du même ordre a été obtenue avec des solutions de sels minéraux contenant essentiellement ClNa, de $\Delta t = -0,36^{\circ}$ C environ. L'hémolyse apparaît donc *in vivo* plus faible avec le polymère que ne le laisse prévoir le Δ cryoscopique.

Pour toutes les autres solutions, la bilirubine reste inchangée, ce qui confirme l'absence d'activité hémolytique propre des trois molécules, même à forte dose.

Notons qu'une réserve doit toujours être faite dans l'interprétation de la bilirubine biliaire totale ; elle ne reflète que la somme de deux phénomènes : l'excrétion normale du pigment par la cellule hépatique, qui peut être plus ou moins modifiée dans son rendement par les produits étudiés, et d'autre part l'hémolyse, qui n'est donc pas étudiée de façon parfaitement pure. Quantitativement, cependant, ce dernier phénomène devient très vite prépondérant dès que la destruction globulaire est tant soit peu importante.

CHAPITRE VII

ACTION DES POLYMERES SUR L'OXALOSE RENALE
EXPERIMENTALE DU RAT

Nous avons découvert il y a quelques années que le PF-68 aggravait fortement chez le Rat les lésions rénales de l'oxalose expérimentale et cette constatation est le point de départ de notre travail. Aussi avons-nous repris en détail cette étude, en comparant les trois polymères dont nous analysons les effets.

I.— TECHNIQUES .A) Protocoles expérimentaux :

Nous rapporterons ici principalement deux expériences, portant dans notre nomenclature les numéros AF et AG, et dont nous donnerons l'organisation détaillée. Nous aurons cependant l'occasion de faire allusion à d'autres expériences dont le plan général relève toujours du même principe.

L'oxalose rénale est facilement obtenue chez le Rat mâle par administration d'éthylène glycol dans l'eau de boisson à la dose de 1 p. 100, pendant deux à quatre semaines (CHIRAY, 1938). Nous avons standardisé cette méthode et l'avons adoptée comme technique d'essai de toutes substances pouvant agir sur le rein malade (DEBRAY et Coll., 1963 a).

Les animaux, Wistar mâles, souche CNRS (1) sont répartis au hasard en cages de cinq, suivant un plan variable selon les expériences. Dans les séries destinées à devenir lithiasiques, l'eau de boisson est remplacée par une solution à 1 p. 100 d'éthylène glycol (2).

Les traitements, toujours organisés selon un plan factoriel, ont été les suivants :

1.— Série AF : Quatre-vingt rats mâles sont répartis en huit groupes expérimentaux, chacun des groupes comportant dix animaux, et traités comme suit : 1/ Témoins, 2/ PF-68 seul, 3/ PEG 6000 seul, 4/ PVP 11.000 seule, 5/ EG seul, 6/ PF-68 + EG, 7/ PEG 6000 + EG, 8/ PVP 11000 + EG.

Les macromolécules sont administrées par injection intramusculaire d'une solution à 20 p. 100 dans l'eau distillée, à la dose de 0,8 ml/100 g de poids d'animal, soit 1,6 g/kg, par injection. Cette dose a été choisie comme donnant d'après des expériences antérieures, des lésions reproductibles avec le PF-68.

Les animaux sont d'abord maintenus en observation pendant une période de 8 jours. Puis commence la période d'intoxication, qui dure deux semaines et demie. Les injections des macromolécules, au nombre de quatre, ont été effectuées les premier, cinquième, huitième et dix-septième jours de la période d'intoxication. Pour un certain nombre d'animaux des groupes 2, 3 et 4, une cinquième injection a été effectuée une demi-heure avant le sacrifice, dans le but de rechercher une modification histologique éventuelle et fugace survenant juste après l'injection.

(1) Gif-sur-Yvette — Centre de Sélection des Animaux de Laboratoire.

(2) PROLABO, pour usages scientifiques.

L'éthylène-glycol à 1 p. 100 dans l'eau de boisson, est remplacé au onzième jour par de l'éthylène-glycol à 0,5 p. 100 en raison de la mortalité assez importante alors survenue.

Pendant toute la durée de l'expérience, le poids des animaux est noté trois fois par semaine et la consommation de boisson relevée chaque jour.

Le sacrifice est effectué par décapitation. On recueille du sang pour un dosage d'urée, prélève et pèse les organes suivants : reins, foie, rate, coeur, surrénales. Un fragment de chacun de ces organes, ainsi qu'un fragment de pancréas est fixé au formol pour l'examen histologique. Un fragment de rein est fixé à l'acide osmique à 2 p. 100 en tampon de Palade en vue de la microscopie électronique.

2.— Série AG : Dans cette expérience, quatre lots de dix animaux ont été répartis en cages de cinq ; ils ont reçu les traitements suivants : 1/ Témoins, 2/ EG seul, 3/ PEG seul, (3 injections intra-musculaires par semaine de polyoxyéthylène-glycol 6000, à raison de 0,8 ml/100 g d'une solution à 20 p. 100 du polymère dans l'eau distillée), 4/ EG + PEG.

Observation : 3 semaines ; traitements : 3 semaines ; 9 injections au total. La moitié du lot EG/PEG a été sacrifié au bout de 10 jours après avoir reçu 4 injections seulement de PEG. Sacrifice par décapitation.

Prélèvement des organes : comme précédemment ; fixation au Carnoy pour la microscopie optique ; dosage d'urée et protides totaux sur le sérum. Technique de SKEGGS pour l'urée et de CHARLOT, ROZE, SOUCHARD (1967) pour les protides totaux, toutes deux à l'auto-analyseur Technicon.

B) Technique d'exploitation des résultats :

Les résultats pouvant s'exprimer d'une manière quantitative (poids, boisson, dosages biologiques, poids des organes) sont analysés sur ordinateur grâce à un programme d'analyse factorielle 2×2 (ROZE, 1969). Pour chaque polymère une analyse de variance est effectuée, qui donne trois résultats : action de l'EG seul, action du polymère seul, interaction entre polymère et EG. Lorsque le poste interaction est significatif, cela signifie que les effets du polymère et de l'EG ne sont pas additifs, mais qu'il y a soit antagonisme (interaction négative), soit potentialisation (interaction positive).

C) Techniques histologiques :

1.— Microscopie photonique :

Fixation : formol à 10 p. 100 neutralisé, ou liquide de Carnoy (Alcool 100° 6 vol., chloroforme 3 vol., acide acétique 1 vol.). Colorations : Hématéine, éosine, safran ; parfois P.A.S. avant et après amylase.

2.— Microscopie électronique : deux types de fixation ont été employés :

a) Fixation de petits blocs (1 mm³) : acide osmique 2 p. 100 en tampon de Palade : 1 h à 40° C ; lavages ; alcools ; oxyde de propylène ; inclusion en épon.

b) Fixation par perfusion :

La conservation de la structure cellulaire au niveau des tubules rénaux est très difficile à obtenir. La fixation par blocs permet d'observer les organites cellulaires, mais les cellules elles-mêmes sont gonflées et souvent lésées, d'autant plus que le tampon de Palade est hypotonique. Pour observer la structure tissulaire intacte, nous avons fixé quelques reins par perfusion de glutaraldéhyde à 2 p. 100 dans du liquide de Tyrode modifié (à 75 p. 100 de Na⁺) selon la formule de MAUNSBACH 1966 b.) NaCl 6,0 g ; KCl 0,2 g ; CaCl₂ 0,2 g ; PO₄H₂ Na. OH₂ 0,05 g ; Mg Cl₂. 6 OH₂ 0,1 g ; CO₃ H Na 1 g ; glucose 1 g ; glutaraldéhyde à 25 p.100 80 ml ; OH₂ q.s.p. 1 l. Ce mélange a un pH de 7,3 à 7,4 et une osmolarité de 354 mOsm.

La perfusion se fait par voie rétrograde, dans l'aorte abdominale, qui est

cathétérisée près de sa bifurcation distale avec une aiguille de 12 à 14/10^e, cou-dée à angle obtus pour faciliter l'insertion, et connectée à un flacon à perfusion de 500 ml avec chambre à gouttes et dispositif de réglage de débit. Immédiatement avant la perfusion, le fixateur est réchauffé un peu au-dessus de 37° C ; la pression de perfusion est de 100 à 150 cm d'eau. L'animal est anesthésié par 35 mg/kg de Nembutal, voie intrapéritonéale. Les opérations sont effectuées dans l'ordre suivant (un aide est nécessaire) :

- Insertion de la canule dans l'aorte,
- Ouverture large de la veine cave inférieure avec des ciseaux fins, pour créer la sortie du fixateur,
- Démarrage de la perfusion,
- Clampage de l'aorte juste sous le diaphragme, au-dessus des artères rénales. Ce clampage est particulièrement important ; il doit être rapide et définitif. On le pratique avec un doigt ganté, puis éventuellement, après une ou deux minutes, avec un clamp vasculaire, mais il ne faut en aucun cas l'interrompre, sous peine de manquer la fixation,
- Maintien de la perfusion 10 minutes environ.

La perfusion est réussie lorsque les reins deviennent immédiatement jaune clair et durcissent. D'après notre expérience, le rein droit est souvent mieux fixé que le gauche.

Le rein est prélevé, découpé facilement au scalpel et les blocs sont fixés 1 à 3 heures dans le même fixateur à 4° C. Il vient ensuite : lavages au Tyrode ; post-osmification 1 h à 4° C. dans OsO₄ 1 p. 100 en Tyrode ; lavages ; acétate d'uranyle 0,5 p. 100 en Tyrode : 1 h ; déshydratation ; inclusion épon.

Les coupes effectuées à l'ultramicrotome Reichert sont contrastées à l'acétate d'uranyle à 1 p. 100 dans l'alcool à 50° (1 à 2 minutes à 20° C) et au citrate de plomb selon Reynolds (1963) (5 à 10 minutes en atmosphère sans CO₂). Les blocs traités à l'acétate d'uranyle avant inclusion sont seulement contrastés au plomb. Microscopie : Hitachi HU 11 B, films Guilleminot Collodium 4, révélateur Multiflex, tirage Agfa Rapidoprint.

II. RESULTATS :

A) Données biologiques :

1.— Mortalité.

Dans la série AF, formée de jeunes animaux, une mortalité assez importante se manifeste dans les lots traités par les associations avec l'E.G.

Elle se décompose comme suit : 0/10 chez les témoins, et dans les lots PF-68, PEG 6000 et PVP 11000 seuls ; 1/10 (16^{ème} jour) avec EG seul ; 7/10 avec EG + PF-68 (dont 1 au 7^{ème} jour, 1 au 9^{ème} jour, et 5 sacrifiés au 7^{ème} 8^{ème} et 9^{ème} jour en raison de leur mauvais état général) ; 1/10 avec EG + PEG 6000 (au 7^{ème} jour) ; 3/10 (1 au 7^{ème} jour, 1 au 11^{ème} jour, 1 sacrifié le 9^{ème} jour) avec EG + PVP 11.000.

Cette mortalité nous a conduit à arrêter l'administration de macromolécules après la troisième injection (au 7^{ème} jour), puis à diminuer la dose d'éthylène-glycol à 0,5 p. 100 le 11^{ème} jour.

Il est à noter que tous les décès observés surviennent dans les groupes recevant l'association EG/macromolécule. La toxicité est donc bien imputable aux associations et non à chaque facteur employé seul.

Dans la série AG, la mortalité est très faible (ce qui est plus normal) et se décompose comme suit : témoins : 0/10 ; PEG 0/10 ; EG seul 1/10 ; EG + PEG 0/5 et 1/5.

1.— Croissance.

Série AF : L'analyse des poids des animaux a été effectuée aux temps

suivants : début de l'observation, début de l'intoxication, 7ème jour d'intoxication, sacrifice (tableaux LV à LVIII).

Les poids moyens dans les différents groupes s'avèrent très légèrement différents au début de la période d'observation, lors de la répartition des lots expérimentaux. A la fin de la période d'observation, les poids se normalisent et les valeurs moyennes n'apparaissent plus significativement différentes dans les groupes. Pendant l'expérience, l'administration d'éthylène-glycol donne un ralentissement net de la croissance. Au 7ème jour d'intoxication, les analyses statistiques montrent un effet très significatif de l'éthylène-glycol, alors que les macromolécules n'agissent pas sur le poids (Tableau LVIII).

Au moment du sacrifice (Tableau LVIII) c'est-à-dire après 15 à 20 jours d'expérience, les différences pondérales se sont accentuées. L'éthylène-glycol produit toujours un amaigrissement significatif ; aucune des macromolécules employées seules ne donne d'effet, mais il apparaît une interaction positive significative entre éthylène-glycol et PF-68, l'association de ces deux facteurs entraînant un amaigrissement plus net que ne le laisserait prévoir l'addition des effets simples des deux produits.

Série AG : Dans cette série il s'agit de gros animaux, pesant de 400 à 450 g en début de la période d'intoxication à l'E.G. Leur croissance est donc lente. Un amaigrissement significatif apparaît avec l'E.G. seul, mais également avec le PEG seul, bien que moins important. L'association montre une addition des effets de chaque facteur (Tableau LIX). Les résultats rapportés ici et plus loin concernent, sauf indications contraires, le lot EG/PEG ayant reçu la plus forte dose de PEG (9 injections, soit au total 14 g/kg en trois semaines).

3.— Consommation de boisson :

La boisson a été calculée sous forme de consommation moyenne par rat et par jour, à partir des données relevées chaque jour sur chaque cage de cinq animaux. Les tableaux LX et LXVI réunissent ces données pour les deux séries étudiées.

L'analyse du tableau LX (série AF) montre d'abord que l'administration d'éthylène-glycol augmente la quantité de boisson absorbée. Les macromolécules seules ne modifient pas cette consommation ; l'association éthylène-glycol et PF-68 montre une augmentation significative ; au contraire avec l'association éthylène-glycol et PVP, l'interaction est négative, la consommation avec l'association étant plus faible que celle du groupe ne recevant que l'éthylène-glycol seul.

Dans la série AG, (Tableau LXVI), les différences entre groupes ne sont pas significatives. Les moyennes sont aux alentours de 20 à 25 ml/rat/jour.

4.— Urée sanguine :

Les taux d'urée sanguine au moment du sacrifice donnent une indication sur l'état fonctionnel des reins à ce moment. Ils sont rassemblés dans le tableau LXI pour la série AF. Un fait domine ces dosages et explique les résultats des tests de signification, dont certains peuvent paraître curieux : c'est la grande dispersion des valeurs dans les groupes ayant reçu l'éthylène-glycol. Il semble bien que le taux d'urée ne s'élève fortement que lors de la phase terminale des lésions rénales, qui se manifeste par une brusque décompensation de la fonction excrétoire. Ainsi, on trouve dans le groupe éthylène-glycol seul, un animal dont le taux est à 4,05 g/l, alors que tous les autres ont des taux seulement très discrètement augmentés (0,55 à 0,65 g/l). Aucune des macromolécules employées seules ne montre d'effet ; l'association EG-PF 68 donne une interaction forte et très significative ; l'association EG-PEG donne une interaction qui apparaît ici comme non significative à cause de la dispersion, mais dont la raison commande de tenir compte : dans le groupe EG-PEG, 4 animaux sur 9 ont une urée sanguine comprise entre 1,30 et 4,25 g/l, alors

TABIEAU LIX Série AG : Poids des animaux au sacrifice (20 jours de traitement). Moyennes en g.

Date	T	EG seul	PEG seul	EG/PEG	Différenc. entre groupes	Effet EG	Effet PEG	Interaction
Début observation	435	423	408	398	NS			
Début expérience	454	443	422	401	NS			
Sacrifice	464	380	401	299	0,001	0,001	0,001	NS

TABLEAU LX - Série AF - Consommation de boisson pendant l'expérimentation moyennes en ml/rat/jour

V A L E U R S M O Y E N N E S				T E S T S D E S I G N I F I C A T I O N							
pas de polymère				EFFET DES PRODUITS SEULS				INTERACTIONS			

TABLEAU LXI - Série AF Taux de l'urée sanguine en fin d'expérience (moyennes en centigrammes par litre de sang)

V A L E U R S M O Y E N N E S				T E S T S D E S I G N I F I C A T I O N						
pas de polymère				EFFET DES PRODUITS SEULS						
				INTERACTIONS						
pas										
d'EG	39	38	42	42	EG	PF 68	PEG	PVP	EG/EG/PEG	EG/PVP
EG	87	268	145	67	0,05	NS	NS	NS	0,001	NS
									+	

que le dixième, mort spontanément sans que le dosage fut possible, présentait vraisemblablement un taux de l'ordre de 3 à 4 g/l.

Dans la série AG, après des doses plus importantes de PEG, les phénomènes constatés sont exactement semblables : urée deux fois plus élevés en moyenne avec l'association, qu'avec EG seul, mais forte dispersion dans le groupe EG seul et poste "interaction" non significatif. (Tableau LXVI).

5.— Protides totaux :

Dosés dans la série AG, ils ne montrent pas de différences significatives entre groupes (Tableau LXVI).

6.— Poids des organes :

L'étude statistique des variations dans le poids des organes a été effectuée sur calculateur. La correction du poids des organes en fonction du poids corporel a été effectuée avec les coefficients de régression calculés pour les organes de rats témoins de même race (Wistar CF, CNRS), en rapportant tous les poids d'organes au poids d'un animal théorique ayant pour poids corporel la moyenne des poids des groupes comparés (ROZE, 1969).

a) Reins

Les résultats sont réunis dans le tableau LXII pour la série AF. On observe une augmentation du poids des reins dans toutes les séries à l'éthylène-glycol, et une interaction significative avec les associations EG-PF 68 et EG-PEG. Les macromolécules administrées seules sont sans action, et l'association EG-PVP ne semble pas donner d'aggravation sur cette grandeur.

Dans la série AG (Tableau LXVI), on note également une interaction positive significative entre EG et PEG. L'EG seul augmente peu le poids des reins chez les gros rats de cette série. Le PEG est sans action. L'association produit une énorme hypertrophie.

b) Foie.

Dans la série AF (Tableau LXIII), l'éthylène-glycol produit dans l'ensemble une augmentation du poids du foie. Le PF-68 semble ici provoquer également une petite augmentation de cet organe, de faible amplitude cependant. Dans la série AG (Tableau LXVI), on ne note pas de variations significatives.

c) Surrénales

Une constatation essentielle ressort de l'étude du tableau LXIV (série AF) : l'augmentation importante et très significative dans le groupe recevant l'association EG et PF-68. Quant à l'éthylène-glycol seul, il semble donner une petite diminution du poids des surrénales, à la limite de la signification.

Dans la série AG on retrouve une interaction EG/PEG, analogue à celle trouvée avec une plus faible dose de PF-68 (Tableau LXVI).

d) Rate

Les différents groupes sont dans l'ensemble peu différents. Seule apparaît une interaction dans la série EG/PF-68, qui montre une rate plus petite que ne le laisseraient supposer les poids corporels des animaux (Tableau LXV).

e) Coeur

Aucune différence significative n'apparaît entre les groupes dans la série AF. Par contre, dans la série AG, l'éthylène-glycol apparaît responsable d'une petite augmentation du poids du coeur (tableau LXVI). Cette variation est sans doute en rapport avec les modifications circulatoires induites par l'atteinte rénale.

B) Données histologiques :

1.— Rappel de la structure du rein chez le Rat normal.

Nous décrivons successivement les différentes parties du néphron dans leur ordre physiologique, c'est-à-dire : glomérule, tube contourné proximal, anse de Henlé, tube contourné distal, tube collecteur.

TABLEAU LXVI : Série AG : Boisson, urée, protides totaux, poids des organes au sacrifice.

	T	EG	PEG	EG/PEG	Différenc. entre groupes	EG seul	PEG seul	Interaction
Boisson (ml/rat/jour)	23,8	25,1	21,4	20,0	NS			
Urée (cg/l)	44	288	51	523	0,001	0,001	NS	NS
Protides totaux (g/l)	64,8	66,1	65,8	64,5	NS			
Reins (g)	2,13 (1,86)	2,75 (2,82)	1,81 (1,80)	4,47 (4,89)	0,001	NS	NS	0,05
Foie (g)	12,45 (11,06)	9,06 (9,44)	10,99 (10,94)	8,72 (10,84)	NS			
Surrénales (mg)	48,5	48,5	45,0	60,2	0,05	NS	NS	0,05
Rate (g)	0,656 (0,588)	0,538 (0,557)	0,604 (0,602)	0,487 (0,590)	NS			
Coeur (g)	1,039 (0,910)	0,933 (0,968)	0,885 (0,880)	0,851 (1,046)	0,01	0,001	NS	NS

a) Glomérule :

La capsule de Bowman se développe autour du bouquet des capillaires glomérulaires comme une enveloppe épithéliale à double paroi. La zone appliquée étroitement sur les capillaires est nommée couche viscérale (épithélium glomérulaire), et la paroi externe couche pariétale (épithélium capsulaire). Entre les deux, l'espace capsulaire ou espace de Bowman.

La couche pariétale est un épithélium pavimenteux plat typique, en continuité avec le tube proximal au niveau du pôle urinaire du glomérule. La couche viscérale se différencie au cours de l'histogenèse pour former des cellules très particulières : les podocytes. Ces cellules possèdent des prolongements primaires dont sont issus à leur tour d'autres plus fins : les pédicelles. Ces prolongements sont entrelacés avec les prolongements semblables de cellules voisines, dont ils semblent séparés par des fentes étroites d'environ $250 \text{ \AA}$ (fentes de filtration). Tous ces prolongements reposent sur une membrane basale séparant l'épithélium de l'endothélium des capillaires glomérulaires.

L'épithélium s'étend sur la surface exposée des capillaires et sur les espaces libres entre eux (fig.31).

L'endothélium semble être, soit très fin par endroits, soit discontinu, car on y observe de petites ouvertures arrondies de 500 à 1000 $\text{\AA}$ de diamètre.

Si les fentes entre les prolongements les plus fins de l'épithélium viscéral, d'un côté de la membrane, et les fines fenestrations de l'endothélium, de l'autre côté, existent réellement chez l'animal vivant, la formation du filtrat glomérulaire dépend uniquement de la membrane basale comme filtre.

Cependant, la majorité des auteurs admet actuellement (BLOOM et FAWCETT, 1968) que les fentes de filtration sont fermées par une fine membrane d'environ 50 $\text{\AA}$ d'épaisseur, tandis que les pores capillaires sont ouverts (fig. 31 et 32). La membrane basale est continue dans tout le bouquet capillaire. De 0,1 à 0,15 μ d'épaisseur, elle comprend un réseau de fines fibrilles incluses dans une matrice homogène. Elle semble être en perpétuelle régénération (KURTZ et FELDMAN, 1962).

Dans les expériences de GRAHAM (1966), chez la Souris, la peroxydase du Raifort (PM = 40.000) traverse facilement la basale ; la myoperoxydase (PM = 160.000) traverse la basale, mais est arrêtée au niveau de la fine membrane des fentes de filtration. C'est donc peut-être cette dernière qui serait responsable de la perméabilité différentielle aux protéines de tailles moléculaires variées.

Un troisième type de cellules semble présent dans le glomérule : les cellules mésangiales, en contact direct avec les cellules endothéliales et la lumière des capillaires, sans interposition de membrane basale, et dont la nature et la fonction sont encore hypothétiques (voir MICHIELSEN et CREEMERS, 1967).

L'artériole afférente n'a pas d'adventice distincte ; sa media est formée de cellules musculaires lisses arrangées circulairement. Près de l'entrée du vaisseau dans le glomérule, les cellules musculaires lisses deviennent grosses et pâles à la coloration, ce qui leur a valu le nom d' "épithélioïdes". Elles ressemblent aux cellules du corps carotidien. Elles forment un anneau s'étendant sur 25 à 85 microns le long de l'artériole, et ont reçu le nom de cellules juxta-glomérulaires. Leur innervation n'est pas différente de celle des autres cellules musculaires lisses. Elles sont en étroit contact avec le tubule distal.

La signification physiologique de l'appareil juxta-glomérulaire est une question actuellement en pleine évolution. On discute en particulier son rôle dans la production de rénine, sa nature barosensible, chemosensible, ses fonctions dans le mécanisme de l'hypertension artérielle d'origine rénale et dans le maintien de l'équilibre électrolytique par l'intermédiaire de la rénine (voir HATT, 1967).

L'artériole efférente possède une couche de muscle lisse circulaire, mais

FIGURE 31 - Glomérule de Rat (AF 21 : PEG 6000 4 inj.). Aspect normal.
P = pédicelles, B = membrane basale, H = hématies, Po = pore capillaire d'aspect ouvert, M = membrane sur les fentes de filtration, Fixation : Os O4, immersion.

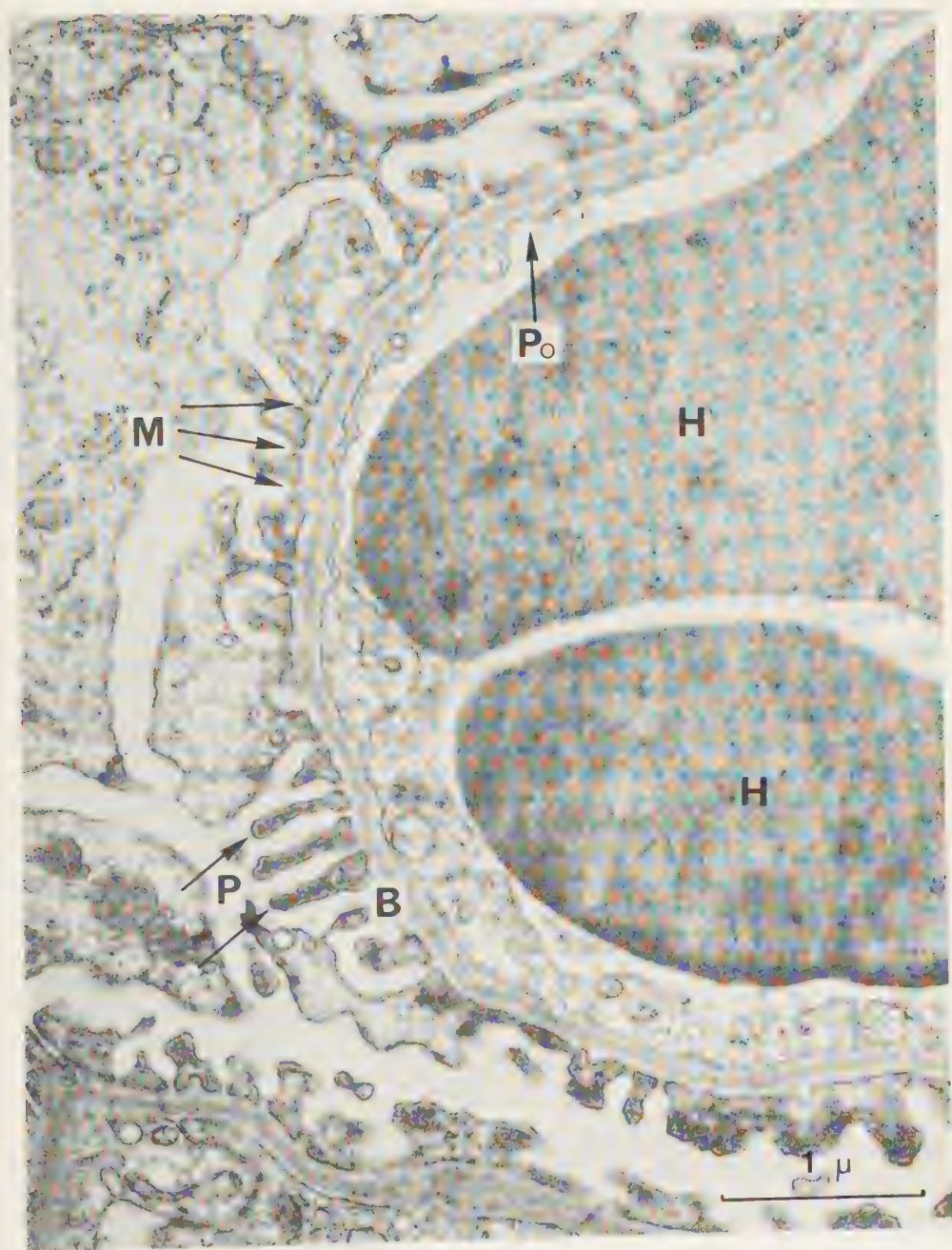
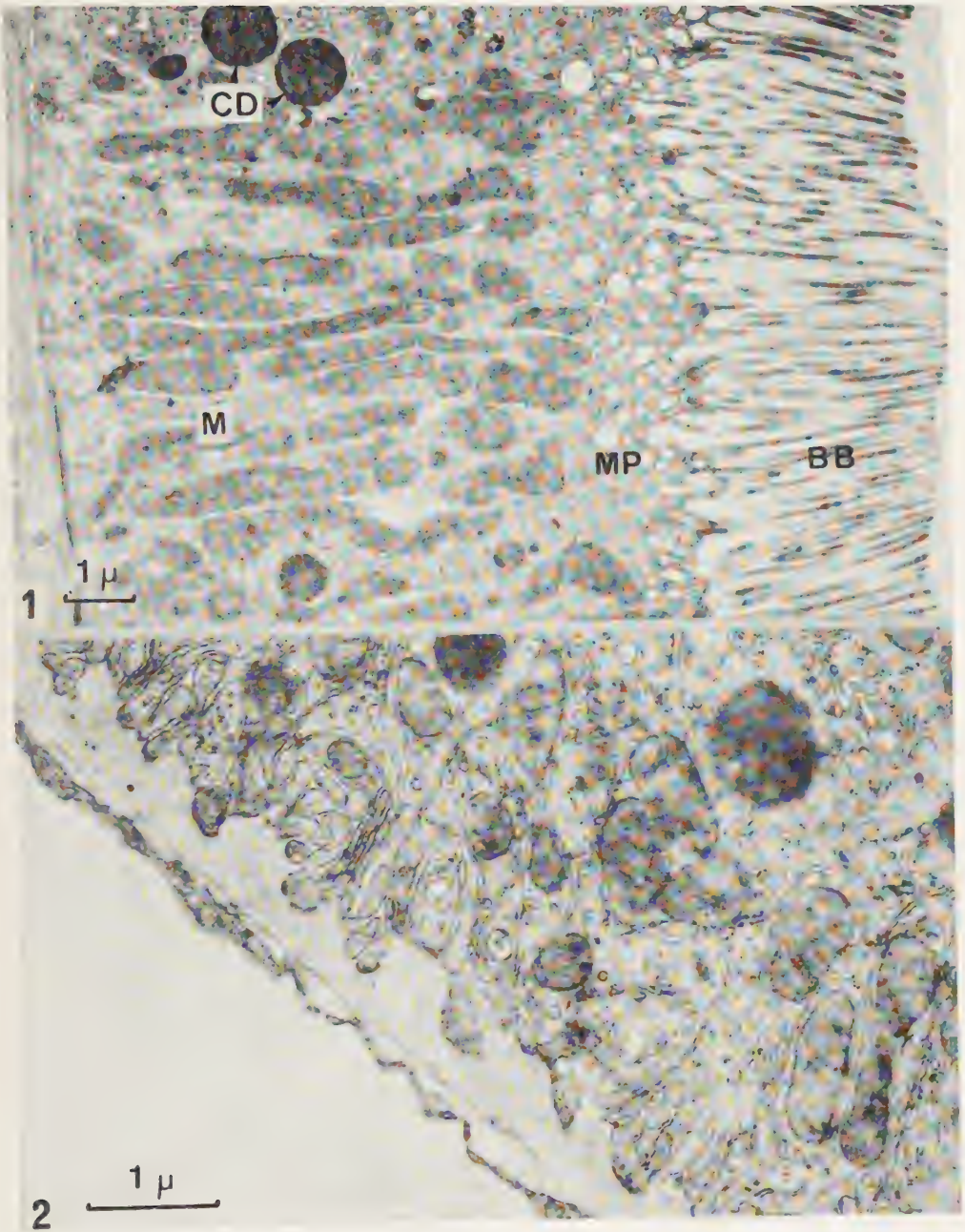


FIGURE 32 - Glomérules de Rat (AF 67 : EG 3 sem. + PEG 6000 4 inj.). U = espace urinaire, C = lumière capillaire, H = hématie. On observe bien sur ces clichés les pores dans l'endothélium du capillaire (flèches). La structure paraît normale. On note pourtant en 1 des aspects de micropinocytose relativement inhabituels dans les cellules endothéliales (MP, flèche). Des pédicelles entrelacés sont bien visibles en 2 (PE, flèche). Fixation : Os O4, immersion.



FIGURE 33 - Tube proximal - Rat témoin - Fixation : glutaraldéhyde par perfusion, post-osmification.

- 1 - Aspect général en coupe semi-fine. Bordure en brosse régulière (BB), nombreuses vésicules de micro-pinocytose (MP), mitochondries allongées et perpendiculaires à la basale (M), corps cytoplasmiques denses de type 2 (CD). D'après la hauteur de la bordure en brosse et la longueur des mitochondries, il s'agit sans doute d'un premier segment de tube proximal.
- 2 - La membrane basale est normalement d'épaisseur irrégulière : de nombreux replis membranaires sont visibles.



n'a pas de membrane élastique. Son diamètre est nettement plus faible que celui du vaisseau afférent. Il est probable que sa contractilité aide à réguler la pression dans le glomérule

b) Tube contourné proximal.

Il nous retiendra plus longtemps car c'est dans cette zone que nous trouverons les lésions les plus marquées. Il a été convenablement décrit seulement récemment, en particulier dans les travaux remarquables et définitifs de l'équipe de MAUNSBACH (1966 a, b, c, d, e, f), car il est difficile à fixer convenablement (le glomérule, au contraire, est facile à fixer, et sa description correcte en microscopie électronique est beaucoup plus ancienne).

α Structure générale : D'un diamètre de 60 μ environ, le tube proximal, au parcours tortueux, constitue une bonne part de la substance corticale.

Il est formé d'une couche de cellules pyramidales tronquées, au cytoplasme abondant et éosinophile ; chaque cellule contient un gros noyau pâle et sphérique. Les limites intercellulaires sont peu visibles en microscopie photonique, car les faces des cellules possèdent des replis perpendiculaires à la membrane basale, engrenés avec ceux de la cellule voisine.

Les cellules fraîches apparaissent opaques et granulaires. Elles subissent de rapides modifications post-mortem, et il est difficile de les préserver convenablement à la fixation.

La partie basale est occupée par des mitochondries allongés, parallèles entre elles et perpendiculaires à la membrane basale, qui atteignent le niveau du noyau, et donnent aux cellules un aspect strié en microscopie photonique.

Sur les lames mal fixées, les bâtonnets dégénèrent en granules ; cela se voit également in vivo et représente un processus dégénératif dans des conditions pathologiques. La surface libre possède une bordure en brosse (fig. 33). En microscopie photonique, la limite entre la bordure en brosse et le cytoplasme est marquée par une couche de granules qui peut apparaître en coupe comme une ligne colorée sombre. Sous cette ligne, et au-dessus du noyau, se trouvent une paire de centrioles et un réseau de Golgi. Dans l'hypertrophie compensatrice du rein, cet organe recule dans la région infranucléaire.

Les bords de la surface libre des cellules, sous la bordure en brosse, possèdent un système de bandelettes obturantes.

Dans le rein humain normal, l'épithélium du tube contourné proximal ne contient pas d'inclusions lipidiques. Dans des conditions pathologiques, ainsi que dans l'autolyse post-mortem, des gouttelettes de graisses neutres et de phosphatides apparaissent rapidement. Chez certains animaux (Chat), ces lipides sont normaux.

Pendant la diurèse, la lumière du tube proximal est large, les cellules sont étroites et aplaties, et la bordure en brosse est haute. Au repos, les cellules sont hautes.

β Les inclusions cytoplasmiques du tube contourné proximal. De nombreuses inclusions cytoplasmiques sont présentes dans le tube proximal. MAUNSBACH (1966 b) a analysé leur infrastructure avec beaucoup de précision dans le rein du Rat. La classification morphologique proposée par cet auteur repose essentiellement sur des différences structurales entre les membranes limitantes. Les corps cytoplasmiques sont ainsi définis d'après deux critères : les caractéristiques de leur membrane et les propriétés structurales de leur matrice ou du matériel d'inclusion.

Quatre types de corpuscules cytoplasmiques ont été ainsi individualisés :

— Corps cytoplasmiques de type 1 (microbodies) : membrane simple à trois couches, 75 Å d'épaisseur. Ces corps sont habituellement irréguliers. Quelle que soit

la méthode de contraste, la membrane est invariablement plus fine que celle des corps cytoplasmiques de type 2, lorsqu'on compare les membranes sur la même coupe. Cette membrane est plus mince que la membrane plasmique ; elle est d'épaisseur comparable aux alpha-cytomembranes, aux cytomembranes à surface lisse et aux éléments des membranes mitochondriales.

On trouve parfois un peu de matériel dense dans la couche centrale claire de la membrane.

Le contenu des corpuscules est légèrement granulaire, et sa densité électronique est semblable à celle du matériel contenu entre les membranes internes des mitochondries, après fixation au tétr oxyde d'osmium. Ces corps possèdent quelquefois une région centrale plus sombre.

Dans 10 p. 100 environ des reins fixés au glutaraldéhyde, un autre type d'inclusion est observé dans ces corps. Elle consiste habituellement en 4 bandes sombres courtes et parallèles, légèrement incurvées. L'épaisseur des deux bandes centrales est d'environ 90 Å, tandis que les bandes externes sont environ deux fois plus fines.

— Corpuscules cytoplasmiques de type 2 : membrane simple à trois couches, 90 Å d'épaisseur. La membrane de ces corps est simple ; à un grossissement suffisant, elle apparaît formée de trois couches, lorsque le contraste est fait à l'acétate d'uranyle ou au citrate de plomb. L'épaisseur est d'environ 90 Å après double coloration uranyle-plomb, sur du tissu fixé au tétr oxyde d'osmium ou au glutaraldéhyde-osmium. On n'observe pas dans ces membranes de substructures globulaires, ou de ponts semblables à ceux qui sont présents dans les éléments de membrane mitochondriale et dans de nombreuses cytomembranes.

La matrice varie considérablement dans sa structure fine aussi bien qu'en densité électronique. Dans certains corps elle est complètement ou partiellement absente. Lorsqu'elle est présente sa densité est variable, de faible à très forte.

La matrice la plus dense est habituellement finement granulaire et montre des composants arrondis ou irrégulièrement colorés de 15 à 150 Å. Des cristaux ont été décrits dans ces inclusions (voir plus loin). Une zone transparente aux électrons d'environ 100 Å de large est quelque fois observée immédiatement à l'intérieur de la membrane limitante des corps cytoplasmiques type 2 avec matrice dense, lorsque l'inclusion est faite dans l'araldite ou l'épon 812. Cette zone claire est absente ou indistincte dans le vestopal. C'est donc sans doute un artefact.

La majorité des corps de type 2 contiennent des inclusions, de forme très variée : membranes, matériel stratifié ou cristallin, corps denses et homogènes, matériel dense, irrégulier ou régulier, corps dense limité par une membrane, vésicules, structures cytoplasmiques reconnaissables, en particulier des mitochondries. Ces mitochondries montrent différentes sortes d'altérations.

D'après les différences dans la matrice ou les corps d'inclusion, l'équipe de MAUNSBACH distingue six variétés principales de corps cytoplasmiques de type 2 dans le tissu fixé au glutaraldéhyde.

— Corps cytoplasmiques de type 3 : non limités par des membranes. Ces corps ne sont pas limités par des membranes distinctes, mais par une zone dense aux électrons, d'épaisseur variable et généralement de contours irréguliers. Leur taille va de 0,1 à 1,5 μ , ils ne sont pas très fréquents et dans la plupart des animaux, leur nombre moyen par section de tubule est inférieur à un.

— Corps cytoplasmiques de type 4 : deux membranes minces de 65 Å. Ces membranes sont soit légèrement séparées, soit apposées, formant une seule membrane à cinq couches d'environ 120 à 130 Å d'épaisseur totale. La structure à cinq couches apparaît clairement seulement dans les coupes colorées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb.

Le contenu des corps de type 4 est très variable : certains contiennent de la substance fondamentale cytoplasmique non altérée avec des particules RNP et des membranes. D'autres contiennent des corps cytoplasmiques de type 1 ou 2, et plus de la moitié de ces corps contiennent des mitochondries ou des fractions de mitochondries.

Leur fréquence est de l'ordre de un à trois corpuscules par section de tube proximal.

Il est possible que quelques-uns des corps ne soient pas complètement entourés par les membranes car des formes en fer à cheval sont observées dans certaines coupes. Toutefois, ces aspects en fer à cheval sont très rares.

— Corps extra-cellulaires : Des corps extra-cellulaires, enfin, sont présents dans le lumen tubulaire entre les digitations de la bordure en brosse des cellules du tube proximal.

. Y Inclusions cristallines intra-corpusculaires dans nos travaux personnels.

Dans nos études en microscopie électronique, il est remarquable de constater que nous avons toujours observé des images en parfait accord avec les interprétations de l'équipe de MAUNSBACH, ce qui laisse à penser que les données de cet auteur peuvent être prises comme référence avec la plus grande confiance. En ce qui concerne la fixation, les tubules ne sont ouverts et ne possèdent leur aspect physiologique que lors de la fixation par perfusion de glutaraldéhyde.

La fixation osmique par immersion, si elle donne de bonnes images au niveau des glomérules, montre toujours des tubes fermés, aux cellules plus ou moins gonflées et à structure difficilement interprétable. Cependant les corpuscules cytoplasmiques peuvent être convenablement étudiés. Nous avons souvent rencontré des corpuscules cytoplasmiques arrondis, de grande taille, contenant des inclusions denses dont l'aspect est vaguement cristallin aux très forts grossissements. D'abord observées dans les coupes de reins d'animaux traités par l'E.G., ces inclusions nous ont au début induit en erreur en laissant supposer qu'il pouvait s'agir des stades initiaux des dépôts oxalo-calciques. Puis les mêmes inclusions furent observées dans des reins témoins, traduisant ainsi leur nature non spécifique.

Grâce à l'obligeance du Professeur Pierre GALLE (1), nous avons pu soumettre certaines de ces inclusions à la microanalyse élémentaire grâce à la microsonde électronique de Castaing que cet auteur a particulièrement travaillé.

Rappelons qu'un bombardement électronique de la matière dans le vide conduit à une émission de rayons X et que l'analyse spectrographique de ce rayonnement X permet de déterminer la nature des éléments présents d'après leurs raies caractéristiques.

La microanalyse a montré dans ces inclusions : l'absence de calcium, la présence de traces de magnésium, de soufre, de phosphore et un peu d'osmium responsable de la densité. Il ne s'agit donc pas d'un dépôt calcique, mais d'une inclusion de nature organique, protéique ou autre, que nous ne sommes pas en mesure d'identifier actuellement.

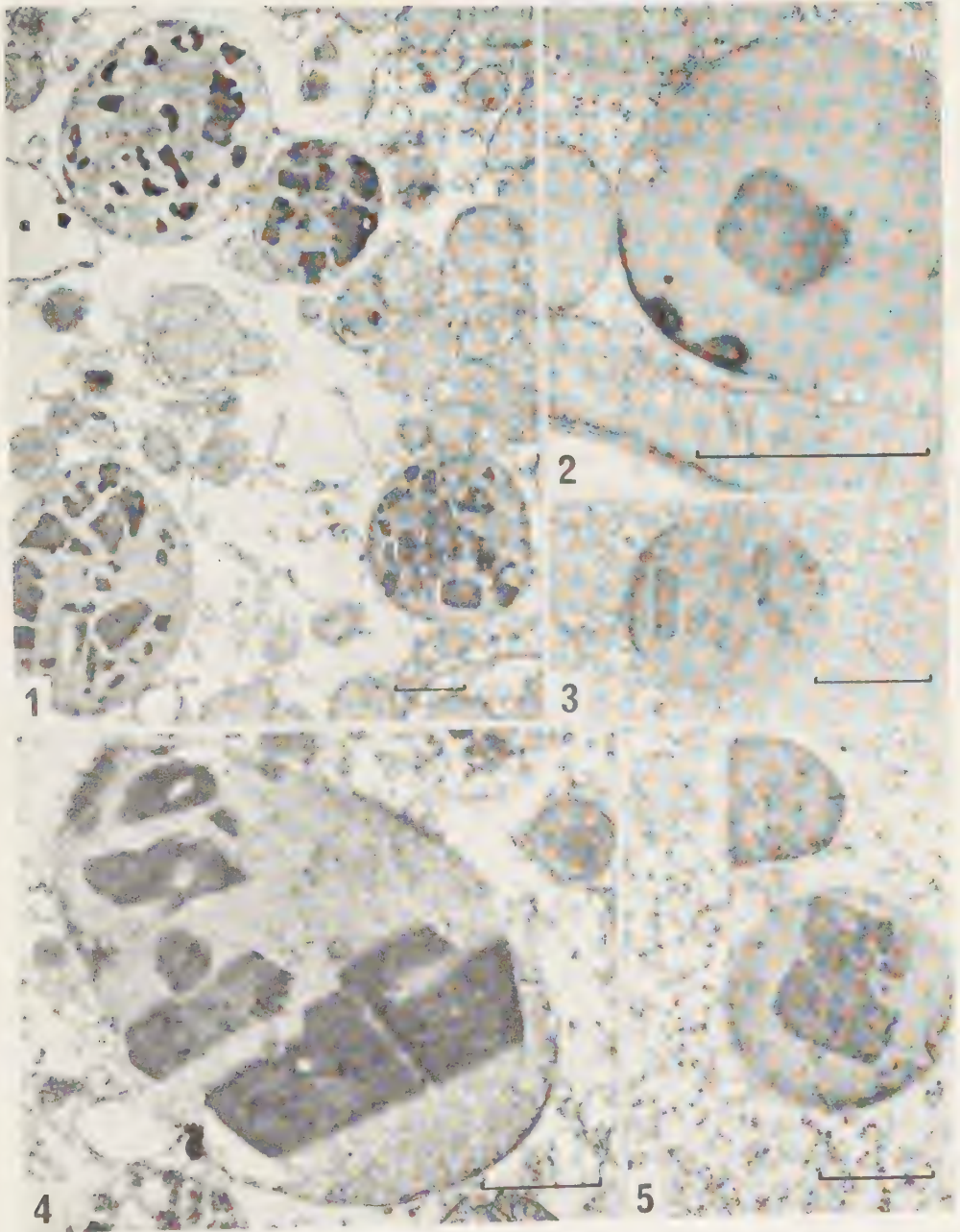
La figure 34 montre quelques aspects caractéristiques de ces inclusions.

. δ Segmentation du tube proximal chez le Rat. Bien que l'ensemble du tube proximal semble avoir essentiellement la même structure, certaines expériences, comme les colorations vitales, l'intoxication à l'uranium, au chrome, au chlorure mercurique, etc... permettent une subdivision de ce tubule en trois ou quatre segments successifs, montrant des réactions différentes. Des localisations enzymatiques variées ont été trouvées à l'histochimie.

SJÖSTRAND (1944) a montré que la fréquence, la taille et la distribution

(1) que nous remercions bien vivement ici.

FIGURE 34 - Inclusions cristallines dans des corpuscules cytoplasmiques du tube proximal, chez des Rats témoins et traités ; 1 : EG 3 sem. + PEG 4 inj. ; 2, 4, 5 : EG seul, 3 sem. ; 3 : témoin. Les inclusions se trouvent le plus souvent dans des corps denses. En 5, on observe une inclusion dans une vacuole. Fixation : Os O4, immersion ; contraste : acétate d'uranyle. Echelle : 1μ .



des granules auto-fluorescents dans les cellules du tubule proximal était très caractéristique de différents segments du tubule proximal dans plusieurs espèces de Mammifères. Il a ainsi reconnu quatre segments différents dans le tube proximal du Rat, bien que le dernier diffère seulement du troisième par l'arrangement de la bordure en brosse.

STRAUS (1964) a observé en microscopie optique deux types de cellules dans le tubule proximal du rat mâle normal. Un des types contient de gros granules à activité phosphatasique acide (1 à 2,5 microns de diamètre) et un autre à peu près aussi fréquent contient des granules à phosphatase acide plus petits.

MAUNSBACH (1966 a) a étudié avec beaucoup de soin des rats normaux de race Sprague-Dawley. Lors de l'examen au microscope à contraste de phase après coupe à la congélation, trois variétés de tube proximal sont observées. Deux types de sections sont présentes dans le cortex, et le troisième est localisé dans la partie externe de la médullaire externe. Les différences portent surtout sur la fréquence et la taille des granules cytoplasmiques et des grandes vacuoles apicales. Ces différences sont plus marquées chez le mâle que chez la femelle. Dans le cortex, deux types de coupes tubulaires sont reconnues. Le premier type est caractérisé par une large bordure en brosse (2 à 3 μ), des mitochondries allongées et des vacuoles apicales habituellement nombreuses et grandes. La plupart des corpuscules cytoplasmiques ne sont pas colorés intensément par le bleu de toluidine ; leur diamètre va de 1 à 2 μ habituellement. Les cellules montrent entre elles des interdigitations abondantes. On les trouve aussi bien dans la zone apicale que dans la zone basale. Les corpuscules cytoplasmiques de type 2, à contenu varié, sont fréquents. Dans l'ensemble, leur matrice est de densité plutôt faible, et contient habituellement du matériel membranaire, en couches, ou dense.

Le deuxième segment est le type le plus commun dans la zone immédiatement sous capsulaire. Ses cellules sont légèrement moins hautes que celles du premier segment ; leur bordure en brosse est plus étroite. Les vacuoles apicales sont habituellement plus petites et moins fréquentes tandis que les mitochondries sont plus courtes et moins nombreuses. Les corpuscules cytoplasmiques se colorent intensément au bleu de toluidine, en particulier après fixation au glutaraldéhyde. Ils sont plus grands chez le mâle que chez la femelle. Leur matrice est le plus souvent dense ; ils contiennent souvent du matériel en couche, et parfois des inclusions à aspect cristallin.

Dans la partie externe de la zone médullaire externe, un troisième type de tubule est observé. Les cellules y sont caractérisées par une large bordure en brosse (2,5 à 4 μ) et contiennent peu de vacuoles apicales, relativement petites. Les mitochondries sont courtes, moins nombreuses que dans les segments précédents. Les cellules ne montrent aucune interdigitation.

Les corps cytoplasmiques de type 1 (microbodies) sont souvent plus nombreux dans le troisième segment que dans les deux autres, et excèdent souvent un micron de diamètre. Les corpuscules cytoplasmiques de type 2 sont petits (moins de 0,8 μ) ; ils possèdent une matrice dense, avec assez fréquemment des membranes et du matériel en couche. L'appareil de Golgi est bien visible ; il entoure le noyau dans la région moyenne de la cellule. Des corps de type 2 sont souvent localisés très près de l'appareil de Golgi. Les cellules du troisième segment contiennent aussi de très longues alpha cytomembranes.

La connaissance de cette segmentation chez le Rat normal permet d'éviter des confusions lors de l'interprétation de changements pathologiques. Ainsi, la différence caractéristique de densité des matrices des corpuscules cytoplasmiques de type 2 dans le premier et le second segment est une variation segmentaire normale pouvant être aisément mal interprétée.

Certaines différences fonctionnelles existent entre les différents segments. Le glucose est absorbé principalement dans la première moitié du tube proximal. Durant des protéinuries expérimentales une augmentation du nombre de granules intracellulaires est observée surtout dans les portions moyennes du tubule proximal, ce qui suggère que des différences segmentaires existent quant au métabolisme ou à l'absorption des protéines dans le tube proximal. Les variations de structure pourraient être en relation avec des différences dans le transport du sodium, du glucose ou des amino-acides.

ε. Localisation des phosphatases acides dans les granules. Le précipité identifiant la phosphatase-acide d'après GOMORI est trouvé dans la lumière (en particulier dans les corps extra-cellulaires) et dans la cellule, principalement dans les corps cytoplasmiques de type 2 et 4 et dans l'appareil de Golgi (MAUNSBACH, 1966 b). On n'observe pas de précipité dans le noyau, dans les mitochondries, dans le cytoplasme lui-même, ni dans les vacuoles apicales ou les tubules apicaux, bien que des corps à phosphatase-acide soient souvent très près de grandes vacuoles apicales. Dans les corps cytoplasmiques de type 2, l'aspect du précipité varie suivant la densité de la matrice. L'activité enzymatique est habituellement observée dans l'appareil de Golgi si le tissu est incubé pendant plus de dix minutes. Le Golgi est toujours plus réactif dans le troisième segment du tubule proximal. Des petites vésicules immédiatement adjacentes au Golgi donnent fréquemment des réactions positives. Des corps cytoplasmiques de type 2 contenant de la phosphatase-acide sont souvent localisés très près de l'appareil de Golgi, en particulier très près des petites vésicules précédemment mentionnées. Dans le troisième segment du tubule cette relation topographique est particulièrement évidente.

De la phosphatase-acide a pu être mise en évidence dans tous les corpuscules cytoplasmiques de type 2 dans le tube proximal, à l'exception des corps multi-vésiculaires qui semblent dépourvus d'activité enzymatique.

Ces résultats permettent de penser que la plupart des corpuscules cytoplasmiques de type 2 peuvent représenter des lysosomes.

Ces données, relativement récentes (1966) nous paraissent meilleurs que celles publiées précédemment par ERICSSON et TRUMP (1964) par ERICSSON (1964), en particulier du fait de l'emploi par MAUNSBACH d'un DL glycérophosphate très pur comme substrat, et de l'absence de rinçage acide après incubation.

Les granules auto-fluorescents, qui correspondent d'une façon très précise avec les granules observés au microscope à contraste de phase, correspondent sans doute aux corps cytoplasmiques de type 2. Toutefois, il n'est pas possible d'exclure la possibilité de quelques-uns des corps de type 2 soient dépourvus de matériel auto-fluorescent et inversement. Ceci implique qu'au moins la grande majorité des granules auto-fluorescents contient de la phosphatase acide. Cette corrélation a été pour la première fois suggérée par NOVIKOFF (1961), puis par KOENIG (1963) en microscopie optique.

c) Anse de Henlé.

Après le tube proximal, les descriptions ultra-structurales se font plus rares dans la littérature, au point que l'on peut dire que la partie distale du tube contourné n'a pas été encore suffisamment étudiée. L'absence de bordure en brosse rend les lectures difficiles sur les clichés. Il est caractéristique de constater que le livre de DALTON et HAGUENAU, publié en 1967 et portant le titre "Ultrastructure of the Kidney" ne consacre que quelques pages au tube distal et aux collecteurs.

La branche descendante de Henlé est un tube droit, fin, de 14 à 22 μ de diamètre extérieur. La branche ascendante est plus épaisse (33 μ) ; la transition entre les deux segments est brutale et survient rarement à la crête de la boucle. Lors du passage du tube contourné proximal à l'anse descendante de Henlé, le ca-

libre de la lumière diminue graduellement, mais l'épithélium change brusquement : les cellules à bordure en brosse sont remplacées par des cellules épithéliales minces et squameuses, au cytoplasme pâle, contenant un noyau légèrement aplati qui provoque un gonflement de la partie centrale de la cellule dans la lumière du tube. Les limites cellulaires sont parfois distinctement festonnées (Ciat par ex.) ; les bords des surfaces libres possèdent des bandelettes obturantes. Du côté de la surface libre, au dessus du noyau, on trouve une paire de centrioles avec un flagelle central. Un appareil de Golgi a été décrit ; les mitochondries sont rares. Etant donné la finesse de l'épithélium, les branches descendantes de Henlé sont facilement confondues avec des capillaires.

Dans la branche ascendante, l'épithélium devient cubique et se colore davantage. Des mitochondries en bâtonnets donnent une striation perpendiculaire distincte de la zone basale, tandis que les limites cellulaires sont mal vues en microscopie photonique. Au contraire, les parties superficielles des cellules, où se trouvent des mitochondries granulaires, sont nettement dessinées. Le noyau est sphérique ou légèrement aplati. Une paire de centrioles occupe la surface libre et semble être pourvue d'un flagelle central.

La branche ascendante entre dans le cortex, retourne vers le glomérule de son néphron, et s'y attache au pôle vasculaire, et en particulier à l'artériole afférente avec ses cellules juxtaglomérulaires. Le côté du tubule en contact avec l'artériole afférente forme un disque elliptique de grandes cellules minces, mesurant $40\ \mu$ sur $70\ \mu$ chez l'Homme. Cette surface, dite macula densa, s'est vue attribuer un rôle dans l'hémodynamique du rein. A partir de cet endroit commence graduellement le tube contourné distal (pour certains auteurs, le tube distal commence avec la partie large de Henlé).

d) Tube contourné distal.

Cette portion du tubule présente de nombreuses boursofflures et contorsions en zig-zag. Elle forme habituellement une boucle dirigée vers la périphérie, située au-dessus du glomérule correspondant. Son diamètre est de 20 à 50 μ et sa longueur 4,6 à 5,2 mm chez l'Homme.

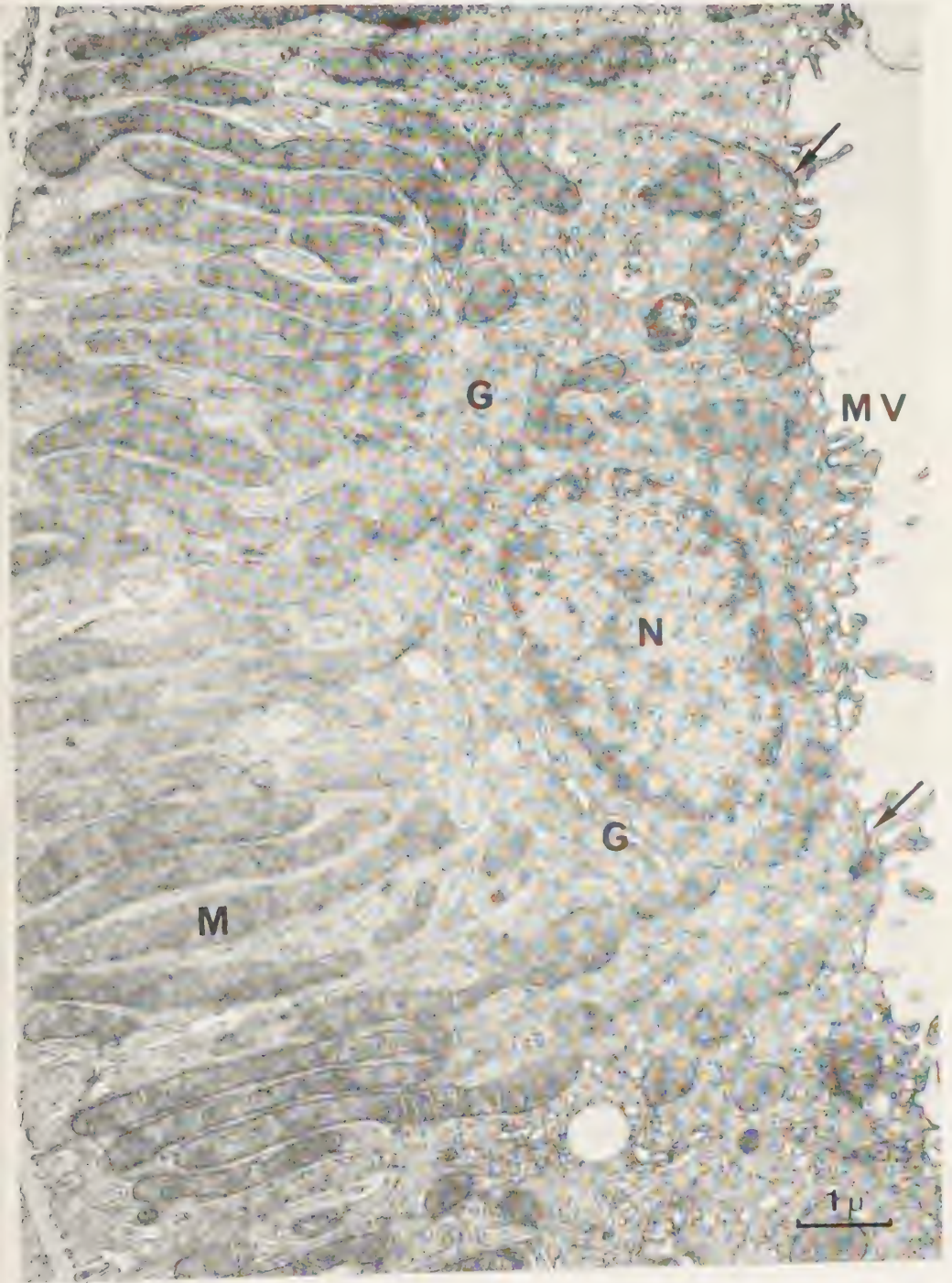
Dans le tube contourné distal, l'épithélium est plus bas et la lumière plus large que dans le tube proximal. Les surfaces libres des cellules montrent des microvillosités. Dans la partie basale, on trouve de longues invaginations de la surface basale des cellules, qui parcourent des distances considérables entre les mitochondries. PEASE (1955) interprète ces structures comme ayant un rôle dans le transport de l'eau, de même qu'il interprète des replis semblables dans les canaux salivaires striés et dans les plexus choroïdes (fig. 35).

Le cytoplasme est moins acidophile que dans le tube contourné proximal. En section transversale, les cellules sont plus nombreuses que dans ce dernier ; au lieu de 3 ou 4 noyaux, c'est 5 à 8 que l'on trouve habituellement. Chaque tube distal se branche par un court tubule connecteur à une des branches initiales des tubes collecteurs. Cette zone a été fort peu étudiée.

e) Tubule collecteur.

Ses cellules possèdent peu de mitochondries, moins de replis basaux que le tube distal (PEASE, 1955). Elles possèdent des cyto-membranes et forment des compartiments extracellulaires, ce qui pourrait constituer un site supplémentaire d'échanges liquidiens. On y trouve des cellules claires, avec quelques microvillosités, des replis basaux nombreux mais moins profonds que dans le tube distal, et des mitochondries relativement courtes et peu nombreuses ; des cellules denses, au cytoplasme plus éosinophile, de formes variées, sont nombreuses ; les replis basaux sont plus longs que dans les cellules claires. De petites vésicules sont localisées sous les microvillosités.

FIGURE 35 - Tube distal - Rat témoin - Fixation : perfusion de glutaraldéhyde ; post-osmification - Coupe semi-fine. Microvillosités (MV), mitochondries (M) très allongées, nombreux replis membranaires basaux, zone de Golgi (G). On observe bien les bandelettes obturantes au niveau des jonctions intercellulaires (flèches).



2.— Les lésions dans la néphrite à l'éthylène-glycol du Rat.

Nous décrivons successivement les aspects de la lithiase elle-même, puis des lésions associées.

a) Nature des cristallisations rénales:

Nous indiquons plus loin l'aspect des cristaux in situ. Leur analyse a été effectuée après extraction (VAILLE, DEBRAY et Coll., 1964) Pour cela, des reins ont été prélevés, sectionnés et raclés doucement avec un scalpel pour gratter une pulpe riche en cristaux. Les débris tissulaires ont été éliminés par plusieurs traitements successifs avec de l'alcool absolu dans un verre de montre ; un mouvement assez rapide de rotation permet d'éliminer par-dessus les bords du verre de montre les fractions les plus légères, tandis que les cristaux restent au fond. De petites quantités de concrétion ont été ainsi isolées.

Dans un deuxième temps, nous avons procédé à une extraction plus brutale, en nous assurant que le produit obtenu était identique au précédent ; des reins frais sont broyés avec un appareil "Ultra Turrax" dans un peu de soluté physiologique. La pulpe obtenue est additionnée d'une goutte de Teepol et de quelques centimètres cubes de chloroforme. Après une vigoureuse agitation, l'ensemble est centrifugé à 1.000 g environ pendant dix minutes.

Dans ces conditions se rassemble un culot comprenant les particules de densité supérieure à celle du chloroforme (1,47 environ).

L'examen microscopique du culot montre des formes analogues à celles que nous décrivons dans les coupes. Les cristaux sont en grande majorité biréfringents, irréguliers, monocliniques ou affectant vaguement d'allure d'oursins. Il y a en outre quelques rares formes cristallines en double pyramide, isotropes.

Des spectres infrarouges (1), pratiqués sur des concrétions provenant de cinq rats femelles et de quatre rats mâles, ont toujours montré des bandes d'absorption caractéristiques de l'oxalate de calcium monohydraté pratiquement pur : trois bandes principales à 1625 ± 5 , 1318 ± 3 et 780 ± 1 cm^{-1} , et deux bandes moins intenses à 949 ± 3 et 883 ± 5 cm^{-1} . C'est seulement dans le cas de lithiase extrêmement importante que l'on a pu déceler d'autres formes que la monohydratée. Il s'agissait vraisemblablement de l'hydrate quadratique à 2,25 molécules d'eau, appelé dihydrate d'après JACOB et LUCZAK, et que nous avons nommé trihydrate comme LECOMTE, POBEGUIN et WYART (POBEGUIN, 1943).

b) Aspect histologique des cristaux :

Nous avons ici travaillé sur des rats mâles, et il a été montré précédemment (TANRET et Coll., 1962 - VAILLE et Coll., 1963), que les femelles sont d'une part beaucoup moins sensibles à l'intoxication, et d'autre part que les aspects histologiques observés sont différents. Nous décrivons donc la lithiase oxalique du mâle, d'intensité variable selon les individus, selon les séries et selon la durée d'intoxication.

Au minimum, ce sont de fines aiguilles, biréfringentes, intra-épithéliales, situées à la partie proximale des tubes.

Il s'agit là d'un stade de début, qui est rarement bien visible en microscopie optique, mais qui a été fort bien montré par GALLE (1964) en microscopie électronique, prouvant que les cristallisations étaient bien intra-cellulaires, ce qui apparaît déjà comme très vraisemblable sur certains de nos clichés optiques de 1963 (DEBRAY et Coll., 1963 a).

(1) Nous remercions vivement Mlle Th. POBEGUIN (Laboratoire du Professeur LECOMTE), ainsi que Mme G. HENOUX (Laboratoire Central de l'Armement), qui ont bien voulu effectuer et interpréter les spectres d'absorption infrarouges.

Dans d'autres cas, les concrétions sont intra-tubulaires, soit fines, associées ou non à des grains oxaliques intra-épithéliaux, soit volumineuses et situées à la partie distale du tube.

Souvent enfin, les concrétions intra-tubulaires sont très abondantes. De taille très variable, elles forment soit des cristaux courts, isolés, rhomboédriques, irréguliers, soit des amas étoilés (en oursin) ou arrondis. Dans ces cas de lithiase importante, on trouve souvent en même temps une lithiase à micro-cristaux intra-épithéliaux ou même interstitiels. Tous les segments du tube rénal sont atteints, sauf en général la pièce intermédiaire. Il existe parfois une vague systématisation, généralement corticale, parfois apicale.

La lithiase siège dans le parenchyme rénal ; nous n'avons découvert que très rarement des calculs dans le bassinet.

Pour l'évaluation quantitative, un coefficient variant de 0 à 4 + est attribué à chaque coupe de rein.

Dans nos études d'infrastructure, nous n'avons pas étudié les cristallisations. Celles-ci nécessitent en effet des techniques spéciales pour être mises en évidence : il faut faire des coupes semi-fines en série et les étudier successivement au microscope optique polarisant pour choisir les coupes renfermant des cristaux. En effet, même lorsque l'oxalose est évidente sur les coupes optiques, le calcul des probabilités montre que l'on a très peu de chances de découvrir un cristal dans un fragment de coupe de 500 Å d'épaisseur et de 0,5 mm de côté. De plus, lors de la coupe normale fine pour infrastructure, les cristaux éventuellement présents quittent la coupe et tombent lors de la flottation sur le couteau du microtome (GALLE, 1964). Ceci explique pourquoi dans notre expérience, nous n'avons rencontré aucun cristal dans les coupes ultra-fines. De plus, notre expérience a été très limitée puisque nous n'avons étudié environ que 500 clichés provenant d'une quarantaine de grilles chez des animaux traités à l'éthylène-glycol.

c) Les lésions rénales associées :

a/ Les lésions épithéliales sont d'intensité variable :

- au minimum, c'est un aplatissement de l'épithélium tubulaire au contact des cristaux ;
- dans d'autres cas, cet épithélium devient turgescent, sauf celui de la pièce intermédiaire qui reste assez souvent intact ;
- quand la lésion est plus accentuée, la nécrose s'étend ; elle touche le tube, soit au voisinage des cristaux, soit dans la zone apicale, soit en totalité ; les noyaux sont alors plus ou moins pycnotiques. Cette atteinte tubulaire est soit diffuse, soit segmentaire ;
- à un degré de plus, les tubes sont très dilatés, quasiment kystiques avec un épithélium aplati, atrophique. Cet aspect en dentelle n'est pas diffus ; il alterne avec des zones de régénération ou même d'hyperplasie. Dans ces lésions en dernier se trouvent généralement d'abondants cylindres albumineux.

Les systèmes vasculaire et glomérulaire restent toujours remarquablement intacts.

Notons que lorsque l'intoxication est suspendue, on note au bout de 10 à 20 jours une transformation plasmodiale de l'épithélium des tubes au contact des cristaux, aspect qui correspond probablement à une véritable réaction de résorption macrophagique à corps étrangers.

b/ Les modifications interstitielles sont, elles aussi, variables en intensité. Au minimum c'est une infiltration inflammatoire lymphoplasmocytaire par petits amas ; elle est quelquefois située au contact des tubes riches en cristaux. Ailleurs, c'est une sclérose interstitielle, qui reste discrète.

d) Corrélations des lésions rénales :

Alors que la lithiase apparaît précocement (nous l'avons observée dans des séries intoxiquées seulement pendant 8 jours), les lésions associées sont plus tardives. La néphrite tubulaire apparaît à partir du stade lithiasique ++. Les altérations interstitielles apparaissent tardivement (stade 4+). Après l'arrêt de l'intoxication au glycol, on observe soit une atrophie complète de l'épithélium du tube, soit une transformation macrophagique de résorption de cet épithélium.

e) Infrastructure des lésions associées :

Nous n'avons pas trouvé au cours de notre brève étude infrastructurale de lésions spécifiques dans la lithiase à l'éthylène-glycol. Notre programme n'était d'ailleurs pas centré sur cette question, mais plutôt sur les lésions provoquées par les polymères.

Parmi les lésions décrites par DAVID et UERLINGS (1964), nous n'avons pas retrouvé l'épaississement des basales des tubes visibles sur les clichés de ces auteurs. Par contre, nous avons noté une certaine prolifération des inclusions cytoplasmiques dans les tubes proximaux, des aspects de gonflement cytoplasmique et de desquamation apicale. Mais il convient de souligner que ces aspects ne sont absolument pas spécifiques et peuvent très bien se trouver comme artefacts après fixation osmique par immersion. C'est ce qui fait que sous ce rapport les résultats de DAVID et UERLINGS ne sont pas absolument concluants, non plus que les nôtres, et que la réponse ne pourrait être donnée que par un programme d'étude étendu utilisant uniquement des fixations par perfusion in vivo.

Les glomérules que nous avons pu observer étaient intacts.

f) Autres organes :

Tous les autres organes étudiés (foie, rate, pancréas, duodénum, myocarde, poumons, surrénales, thyroïde et encéphale) restent parfaitement intacts.

g) Essai d'interprétation quantitative :

Il serait fastidieux et peu concluant d'exposer en détail les comptes-rendus histologiques de chaque animal des séries AF et AG. Nous nous sommes efforcé d'en donner une idée semi-quantitative en schématisant sur les figures 36 et 37 les intensités évaluées pour les trois types de lésions suivantes : lithiase, dilatation tubulaire et clarification (lésion décrite plus loin, exceptionnelle avec l'E.G. seul).

Pour établir ces schémas, chaque coupe a été affectée d'un coefficient estimé allant de 0 à 4+. En plus des lésions de base décrites dans les figures, on a trouvé les aspects suivants dans les lots E.G. seul :

— Rats AF 41 à 50 : 4 fois sur 10, présence de légers épaississements de quelques capsules de Bowman ; 2 fois sur 10, légère réaction interstitielle au contact des cristaux ; 3 fois sur 10 : cylindres protéiques intratubulaires ; lésions tubulaires à type de nécrose trois fois sur 10, à type d'atrophie 4 fois sur 10 (parfois mixtes) ; 8 fois sur 10 transformation plasmodiale ou aspects de résorption macrophagique au contact des cristaux. (Ce dernier aspect est sans doute dû à la diminution de la dose d'E.G. intervenue au cours de l'expérience en raison de la forte mortalité observée).

— Rats AG 41 à AG 50 : Jamais de lésions glomérulaires ni de cylindres ; 4 fois sur 10 aspects d'atrophie épithéliale au contact des cristaux ; 1 fois sur 10 ébauche de réaction macrophagique de résorption.

3.— Les lésions par les polymères seuls et dans les associations avec l'E.G.

1/ Avec les polymères seuls (6,4 à 14,4 g/kg en 20 jours) les reins sont quasiment normaux au microscope photonique (rares aspects de microvésiculation ou de clarification tubulaire). Les images des infrastructures sont plus caractéristiques, en particulier la modification de certaines inclusions

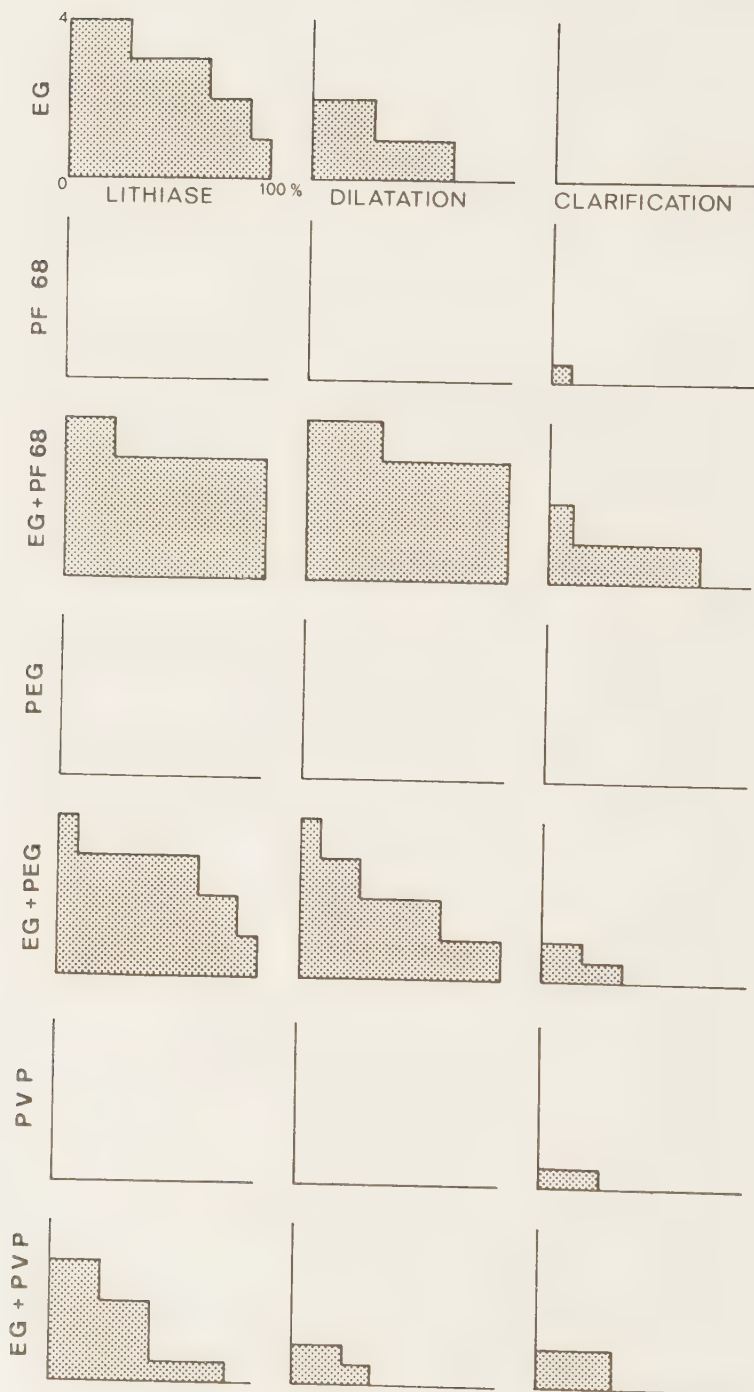


FIGURE 36: Série AF. Tentative de quantification des lésions histologiques d'urée.
Abscisses: fréquence (%) dans le groupe expérimental considéré; ordonnées: intensité des altérations, selon une échelle semi-quantitative subjective (0 à 4+).

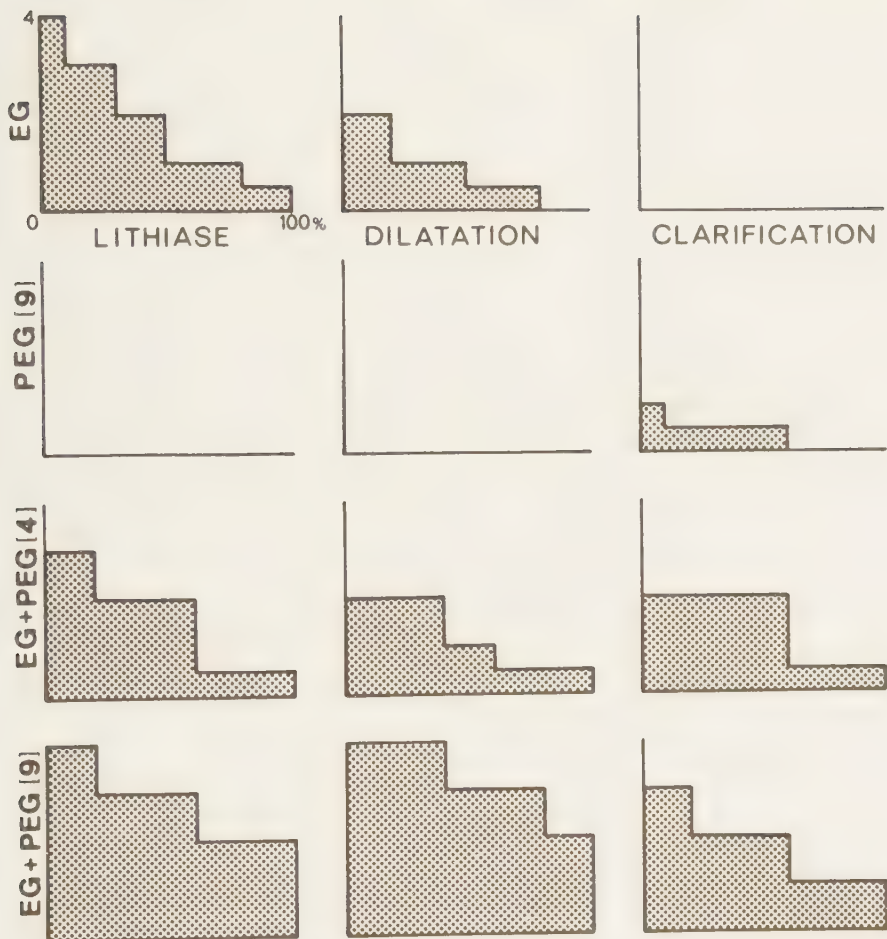
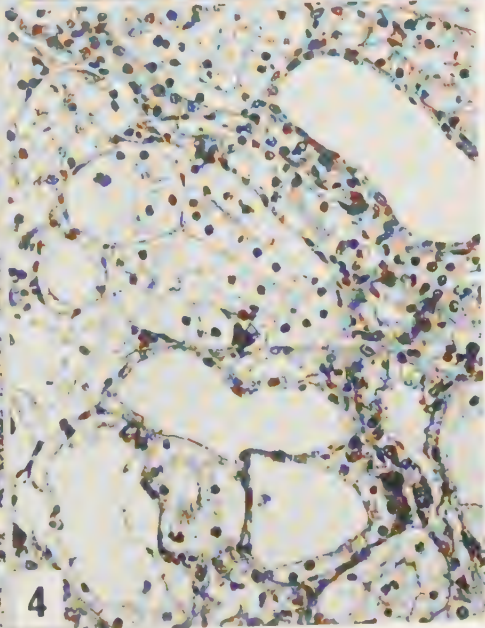
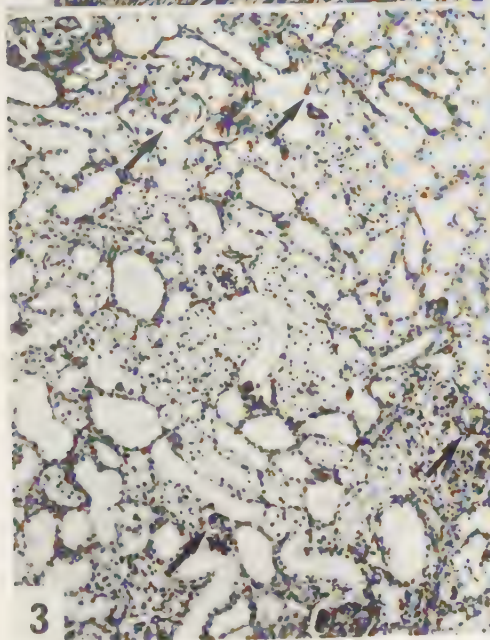
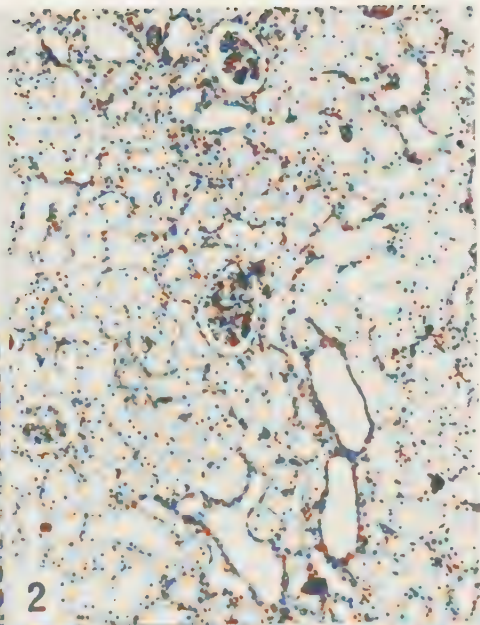
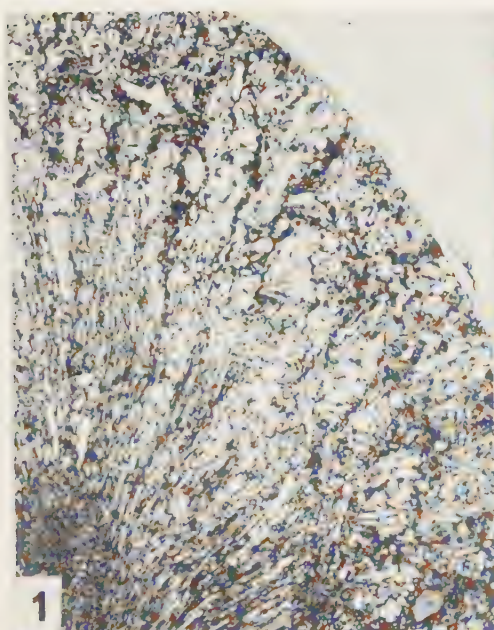


FIGURE 37: Série AG. Tentative de quantification des lésions histologiques du rein. Abscisses: fréquence (%) dans le groupe expérimental considéré; ordonnées: intensité des lésions selon une échelle semi-quantitative (0 à 4+).

- FIGURE 38 -** Aspects de clarification et de dilatation tubulaires par les associations EG-polymères. Traitements expérimentaux : 1, 3, 4 : PEG 9 inj. ; EG 20 j., 2 : PF-68 9 inj. ; EG 20 j.
- 1 - Reins très volumineux ; clarification tubulaire et forte distension avec aspect en dentelle. Lithiase 3+, surtout corticale (assez peu visible à ce grossissement, sous forme de petites taches très denses) (x 12).
 - 2 - (x 90) et 4 (x 225) : clarification, dilatations avec atrophie épithéliale, pycnose. Noter l'analogie des lésions obtenues avec deux polymères différents.
 - 3 - Quelques cristaux dans le champ (flèches) et légère infiltration interstitielle (x 90).



- FIGURE 39 - 1 - Probablement tube collecteur cortical. Corpuscules cytoplasmiques denses dilatés (flèche).
- 2 - Tube contourné proximal. Grand corpuscule avec gonflement sous membranaire. Espace clair sous la membrane (flèches).
- 3 - Nombreux corps denses dilatés dans un tube proximal, avec l'association EG + PF-68.
- Traitements expérimentaux : 1 et 2 : PF-68 4 inj. en 20 j. ;
 3 : PF-68 4 inj. + EG 20 j. Fixation : Os O₄ (LT : lumière tubulaire, N : noyau ; G : Golgi ; M : mitochondrie ; MIC : membrane intercellulaire).

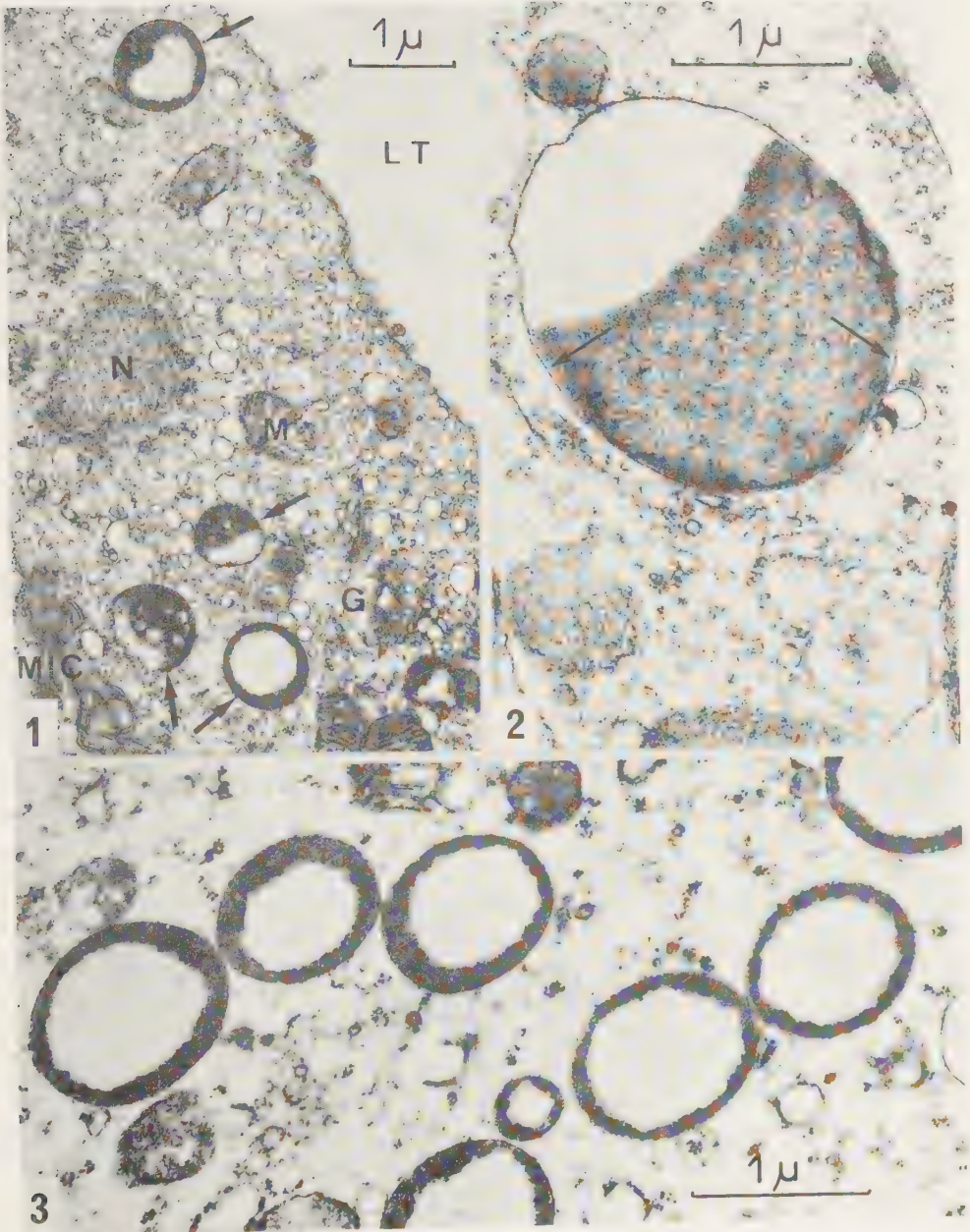


FIGURE 40 - Vacuolisation majeure par l'association PF-68 3 inj. + EG 11 j. Certains corpuscules vacuolisés renferment des débris de matériel osmiophile (2, triangles). On note une rupture des membranes corpusculaires (1, flèches) avec communication des zones dilatées (2, flèche). Fixation : perfusion de glutaraldéhyde, post-osmification. L'identification précise du segment est impossible. (V : vacuole, CI : cellule interstitielle, CAP : capillaire, L : lumière tubulaire).

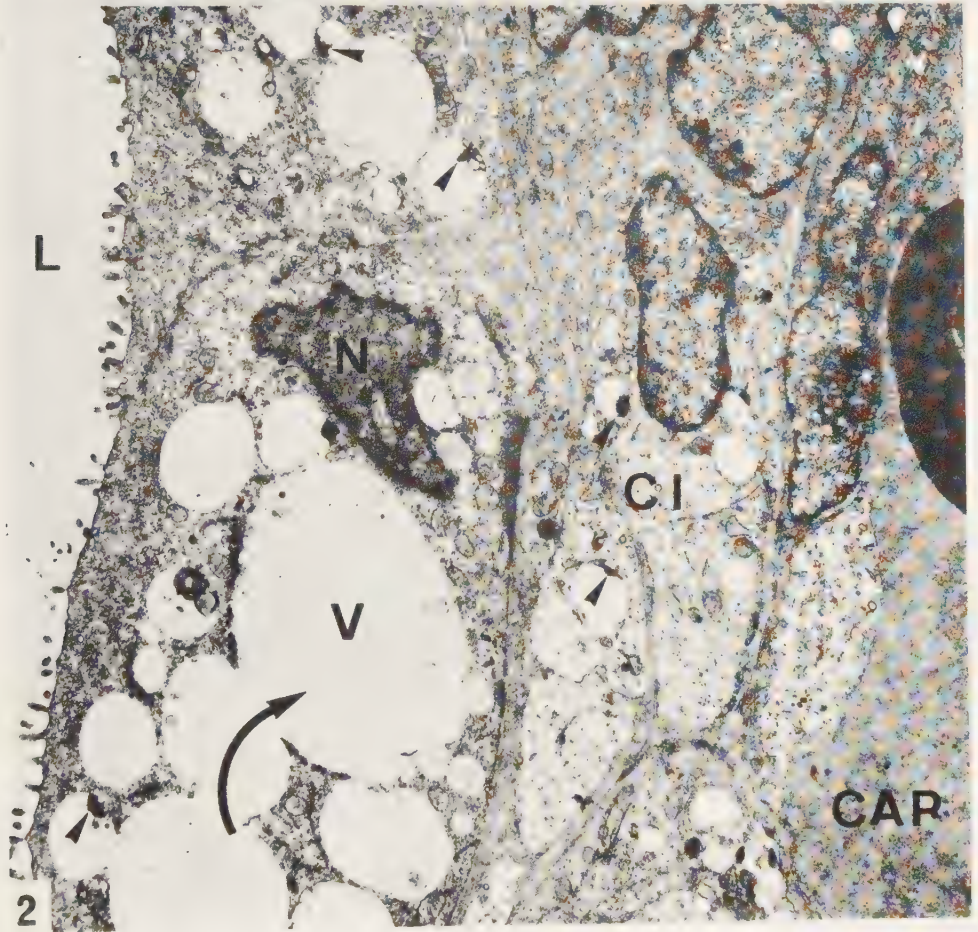
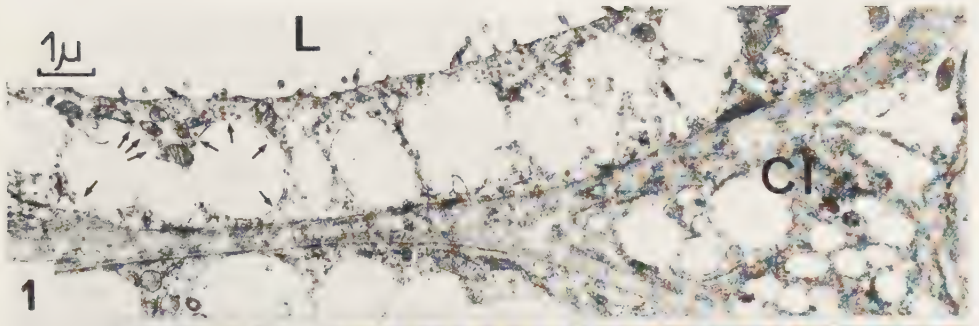


FIGURE 41 - Lésions du tube proximal par association PF-68 3 inj. + EG 11 j. L'identification formelle du segment est ici possible, grâce à la persistance de résidus de bordure en brosse (BB). Beaucoup de mitochondries sont encore visibles, ce qui indique leur atteinte secondaire. Le hyaloplasme est bourré de très petites structures microvésiculaires, sans doute formées par rupture des cytomembranes normales. Confluence des vacuoles (V). Fixation : glutaraldehyde par perfusion, post-osmification.

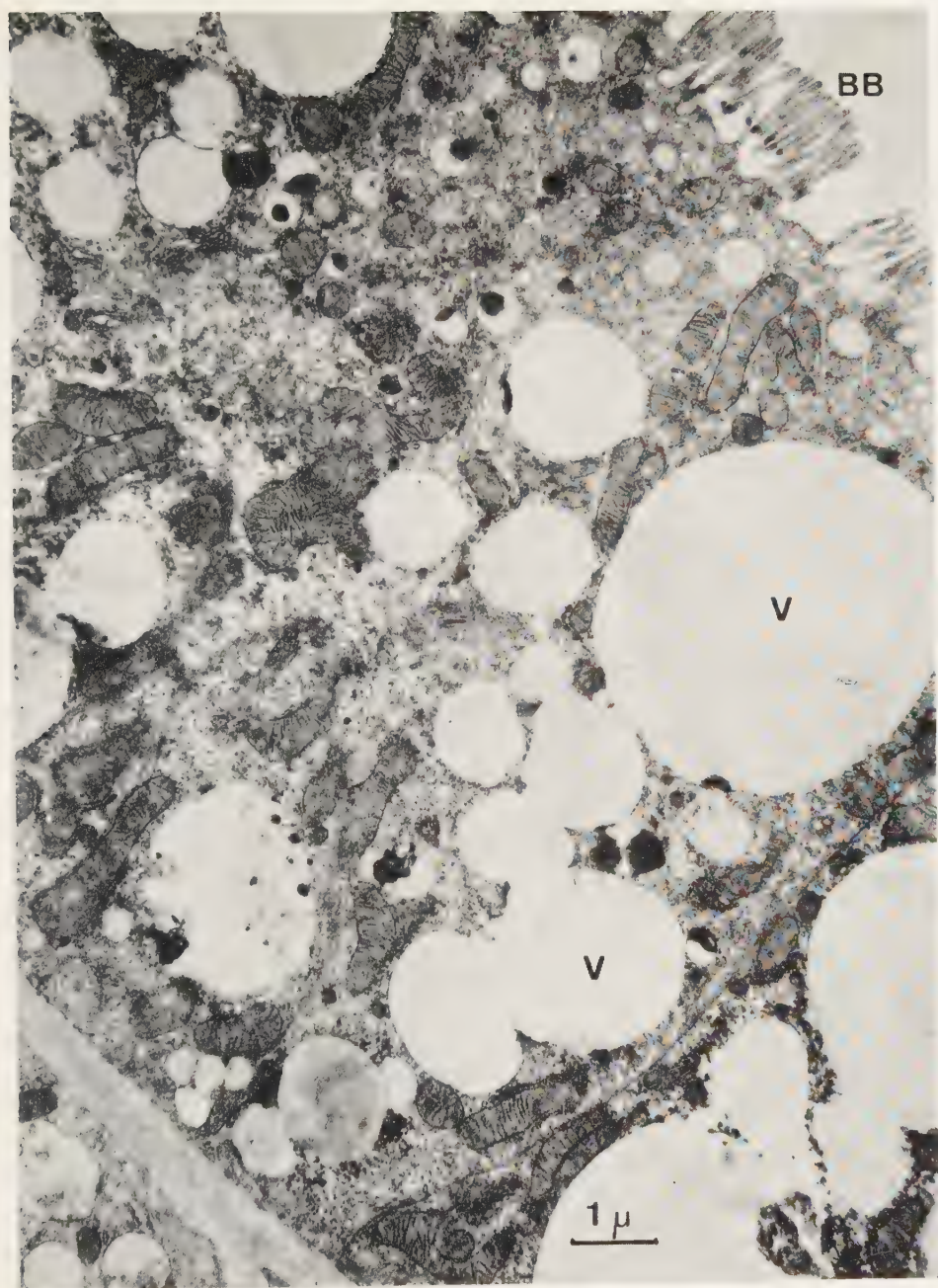
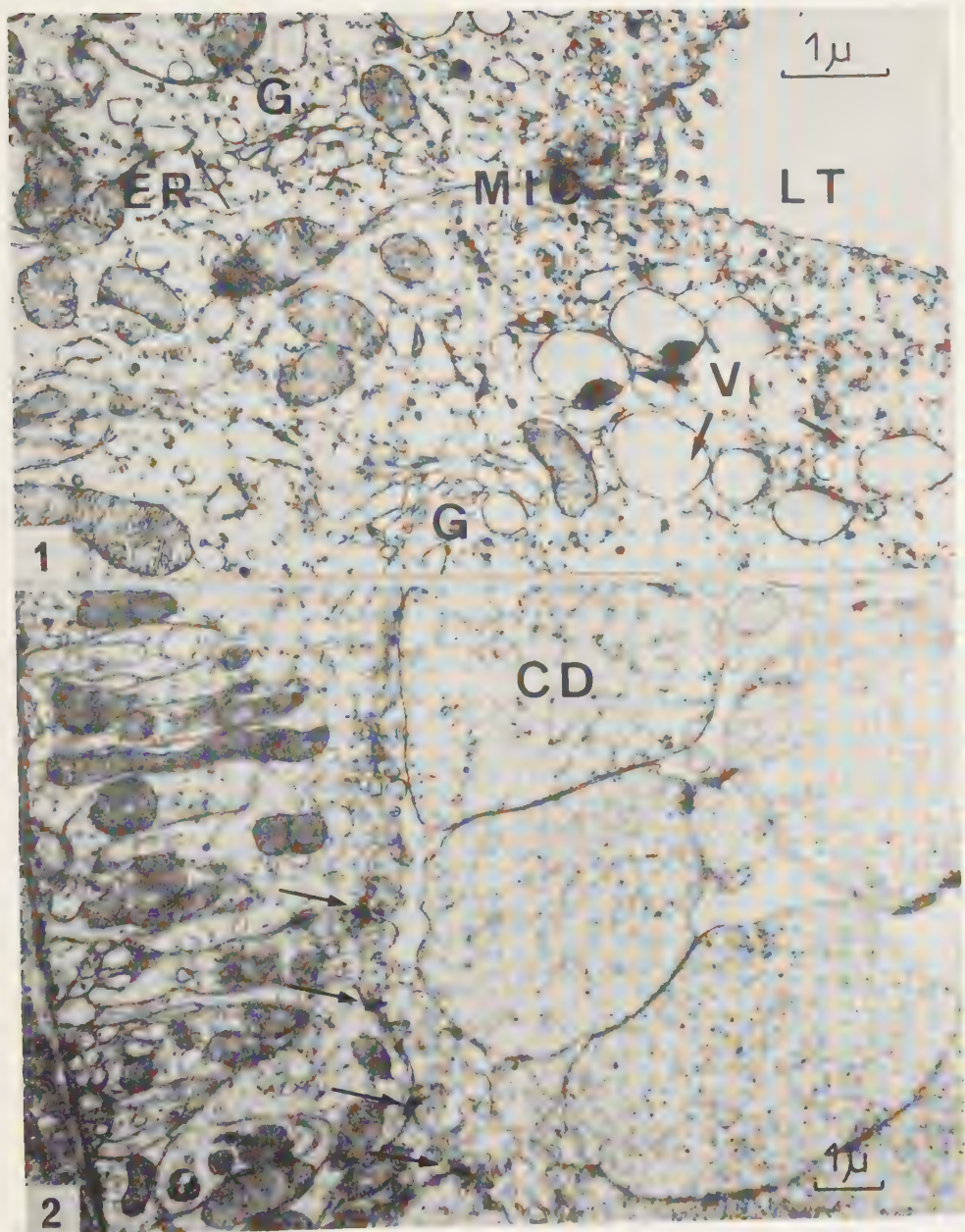


FIGURE 42 - Vacuolisation et desquamation par l'association PEG 4 inj. + EG 20 j. - 1 : zones de dilatation des vacuoles (V), de l'appareil de Golgi (G), de l'ergastoplasme (ER) - 2 : image de desquamation ; de nouvelles bandelettes obturantes (flèches) se forment en haut des replis membranaires intermitochondriaux (C.D. : cytoplasme desquamé). Fixation : Os O₄, immersion.



cytoplasmiques dans les tubes proximaux et distaux (fig.39). Par leur taille, leur osmophilie, les caractères de leur membrane (simple, d'environ 100 Å, avec souvent un espace clair sous-jacent d'épaisseur voisine), ces inclusions semblent pouvoir être identifiées aux corps cytoplasmiques de type 2 (MAUNSBACH, 1966 b), ou corps denses, contenant de la phosphatase acide, et représentant sans doute des lysosomes. Ces corpuscules présentent une zone claire, le plus souvent centrale, qui paraît correspondre à un gonflement par appel d'eau. D'autres corps cytoplasmiques, de forme moins régulière, à contenu clair, se rapprochent des grandes vacuoles décrites dans le tube proximal (fig. 42 - 1).

2/ Les associations EG/PEG et EG/PF-68 provoquent, en microscopie photonique, des lésions très semblables. Deux altérations sont associées en proportions variables : dilatations tubulaires avec aplatissement et atrophie de l'épithélium et aspects de "clarification" (fig. 38). Nous désignons sous ce terme un gonflement et une perte de colorabilité du cytoplasme des cellules tubulaires, sans vacuolisation évidente, ou avec microvésiculation à la limite de la visibilité. La lumière tubulaire est soit obturée par le gonflement cellulaire, soit élargie, son épithélium étant assez plat. La lithiase généralement plus grave qu'avec E.G. seul, reste surtout corticale.

La microscopie électronique montre que les corpuscules cytoplasmiques normaux sont remplacés par des corps vacuolaires. Les uns sont identiques à ceux que l'on observe avec les polymères seuls (fig. 39), les autres, dans les stades tardifs, sont gonflés et perdent leur aspect caractéristique. Enfin, le cytoplasme est complètement envahi par des corps vacuolisés qui repoussent dans une zone périphérique le noyau devenu pycnotique (fig. 40 et 41). Tous les organites normaux ont disparu progressivement. Des structures dilatées existent à tous les niveaux : appareil de Golgi, ergastoplasme, vésicules de pinocytose, mitochondries. La membrane cellulaire ne limite plus qu'un ensemble de sacs membranaires à contenu liquide, correspondant sans doute aux cellules clarifiées des coupes optiques. Des aspects de desquamation cytoplasmique apicale sont parfois rencontrés, surtout avec PEG (fig. 42) (ROZE et MARTIN, 1968).

Les aspects quantitatifs sont schématisés sur les figures 36 et 37. En plus des principales lésions, les faits suivants ont été observés :

a) EG + PF-68 (6,4 g/kg en 4 injections) AF 51 à 59 : 2 fois sur 8 : discret épaississement de quelques capsules de Bowman ; lésions tubulaires à type d'atrophie épithéliale : 3/8 ; transformation macrophagique au contact des cristaux : 4/8 dont deux très légères.

b) EG + PEG : AF 61 à 70 (PEG 6,4 g/kg en 4 injections) : discrets épaississements des capsules de Bowman : 2/10 ; atrophie épithéliale des tubes : 2/10 ; transformation macrophagique discrète : 7/10 ; réaction interstitielle : 2/10 ; cristallisations interstitielles : 2/10.

AG 71 à AG 75 (PEG 6,4 g/kg en 4 injections) : glomérules légèrement congestifs : 3/5 ; réaction macrophagique : 1/5 ; amas lithiasiques interstitiels : 1/5 ; très discrète clarification de certaines cellules centro-lobulaires hépatiques : 1/5 (AG 75).

AG 76 à AG 80 (PEG 14,4 g/kg en 9 injections) : atrophie épithéliale au contact des cristaux : 2/5 ; quelques foyers inflammatoires interstitiels : 3/5 ; atrophie glomérulaire : 1/5 ; légère lithiase hépatique : 1/5 ; début de réaction macrophagique : 2/5.

c) EG + PVP - AF 71 à AF 80 (PVP 6,4 g/kg en 4 injections) : atrophie épithéliale discrète : 1/8 ; légère réaction macrophagique : 2/8 ; quelques petits foyers inflammatoires interstitiels : 1/8.

En conclusion, PF-68 et PEG 6000 ont des effets très voisins, produisant une intense clarification tubulaire. Quantitativement il faut davantage de PEG que

de PF-68 pour obtenir le même effet. La PVP 11.000, par contre, modifie peu les images histologiques de la néphrite à l'E.G. L'aggravation n'y est pas nette, et c'est pourquoi l'infrastructure n'a pas été détaillée dans cette série.

III .— DISCUSSION

A) Reproductibilité technique :

Il est important de savoir dans quelle mesure notre technique de lithiase rénale à l'E.G. donne des lésions reproductibles en fonction des lots de rats et de leur poids, qui n'est pas toujours identique au départ. Aussi avons-nous cherché à récapituler les données d'un certain nombre d'expériences effectuées dans les huit dernières années.

Nous avons pu ainsi réunir les données correspondant à 160 animaux traités par E.G. 1 p. 100 et 153 témoins, répartis en 20 séries expérimentales de 5 à 10 animaux, étudiés entre juillet 1961 et avril 1968. Le but essentiel de cette recherche d'ensemble est de tenter de mettre en relation la dose d'E.G. absorbée et l'intensité de l'oxalose observée. Les quantités d'E.G. ont été calculées à partir des quantités de boisson absorbées par jour et par cage de cinq animaux. Elle n'ont donc qu'une valeur moyenne, puisque la quantité absorbée par chaque animal n'est pas connue, mais on peut supposer que sur une durée suffisamment longue, les variations individuelles ont tendance à s'atténuer. On a ainsi groupé dans le tableau LXVII les consommations d'E.G. par ordre croissant, la durée d'intoxication et l'intensité de la lithiase, selon notre échelle d'évaluation histologique semi-quantitative. On voit que dans les limites explorées (2,9 à 36,8 ml d'E.G. absorbés) il n'est pas possible d'établir une relation entre la durée d'intoxication et l'importance de la lithiase. S'il arrive que dans un lot, un animal soit non lithiasique, il est exceptionnel que plusieurs animaux soient indemnes. Ce phénomène ne s'est produit qu'une seule fois dans notre expérience : la série F, ayant absorbé en moyenne 5 ml d'E.G. par jour et par rat, présente 7 animaux sur 10 indemnes, et 3 peu touchés. Il est vraisemblable que ce phénomène est dû à une erreur expérimentale (utilisation de femelles au lieu de mâles, E.G. de mauvaise qualité ou dilué), mais nous n'avons pu détecter aucune possibilité de ce type dans nos archives. Nous estimons donc qu'il n'y a aucune raison valable d'éliminer cette expérience de la statistique, et qu'il est de notre devoir absolu de la conserver, bien que la considérant subjectivement comme suspecte.

En dessous de 2,9 ml, nous ne disposons pas de données, mais des expériences complémentaires sont actuellement en cours. Notons que DAVID et UERLINGS (1964) décrivent des lésions rénales après administration de 1 ml d'E.G. au Rat, mais sous forme d'une prise orale unique.

Dans le tableau LXVII nous avons aussi reporté quelques autres grandeurs en fonction de la dose injectée. La mortalité ne semble pas directement reliée à la dose, mais due beaucoup plus à des sensibilités individuelles (nous n'avons retenu dans le tableau que les groupes dans lesquels le lot témoin ne présentait pas de mortalité ; c'est ainsi que la série P a été éliminée). Le poids des reins semble un peu plus relié à la dose que l'intensité des cristallisations, mais cette relation reste très vague. Il est d'autant plus augmenté que l'amaigrissement est plus net. La boisson est augmentée de façon régulière, de 5 à 53 p. 100 selon les lots.

Nous avons aussi tenté de mettre en rapport le poids des rats en début d'expérience (considéré comme une expression de leur âge), avec la gravité des lésions obtenues (Tableau LXVIII). On n'observe guère de relation entre cette grandeur et les concrétions rénales, exprimées par ce que nous appelons "score p. 100" (Pour calculer ce score on part du nombre de croix totales observées dans le lot, que l'on rapporte à un maximum observable qui vaut quatre fois le nombre des animaux, c'est-à-dire le score que l'on obtiendrait si tous les ani-

TAPLEAU LXVII : Relations de l'intensité des cristallisations rénales et de divers paramètres avec la dose d'éthylène-glycol ingérée.

E.G. absorbé (ml)	Série	Nombre jours	Nombre animaux	Lithiase rénale					Score %	Morta- lité %	Poids au sa- crifice % des T	Reins % des T	Boisson % des T
				0	+	++	+++	++++					
2,92	E	8	10	1	3	2	1	3	55	20	100		112
3,09	P	8	9	1	4	4			33		103	123	152
3,10	J	8	10		1	7	2		52	0	107	116	131
3,50	G	8	10		2	2	2	4	70	0	77	175	233
4,06	R ₁	12	5		5				25	0	98	109	114
4,59	O	11	4		1	2	1		50	40			
4,77	AG	19	10		5	2	2	1	47	10	82	129	105
5,08	F	22	10	7	3				7	0	108	109	122
5,13	AF	18	10		1	2	4	3	72	10	86	148	120
5,60	N ₁	18	5			4	1		55	0	74	206	124
6,57	AI	18	7		1	4	1	1	57	30	89	205	122
7,98	S	16	10			3	2	5	80	30	89	193	150
9,20	N ₂	25	2				2		75	0	84	264	150
10,6	T	20	10		1		1	8	90	0	88	163	141
11,6	R ₂	26	5		1		3	1	70	0	83	192	133
12,0	AA	28	9		2		2	5	78	20	83	175	126
12,2	AB	42	4		3		1		37	16	101	113	116
12,7	C	30	10			2	2	6	85	10	95	159	153
12,8	H ₃	42	3					3	100	0	63	206	124
36,8	AD	50	8	1		2	2	4	81	0	90	105	111

TABLEAU LXVIII : Confrontation de quelques grandeurs avec le poids des animaux en début d'expérience.

Poids Début E.G.	Série	Score %	Morta- lité %	Reins % des T	Var. Poids %	Poids début E.G.	Série	Score %	Morta- lité %	Reins % des T	Var. Poids %
172	N3	100	0	200	- 29	230	T	90	0	163	2
175	P	33		123	27	240	AD	81	0	105	22
175	AF	72	10	148	13	242	R2	70	0	192	- 7
175	F	7	0	109	8	254	R1	25	0	109	9
178	N2	75	0	204	- 23	255	AB	37	16	113	17
192	G	70	0	175	- 7	302	0	50	40		5
198	N1	55	0	206	- 15	322	AI	57	30	205	- 6
218	C	85	10	159	38	341	E	55	20		- 2
225	J	52	0	116	26	371	AA	78	20	175	- 6
229	S	80	30	193	- 4	448	AG	47	10	129	- 14

maux avaient une lithiase maximale).

Par contre, la mortalité semble plus forte chez les gros animaux : 75 p. 100 des décès ont été observés dans les lots de poids initial supérieur à 250 g, 90 p. 100 dans des lots de poids supérieur à 225 g. L'augmentation de poids des reins et la variation de poids corporel pendant l'intoxication paraissent indépendantes de la valeur pondérale de départ.

Finalement, cette récapitulation qui nous a demandé beaucoup de travail ne semble pas apporter d'éléments très positifs. Cependant, son aspect négatif amène à formuler une constatation d'une importance fondamentale et très encourageante pour nous : "notre connaissance des aspects fondamentaux des lésions d'oxalose par l'éthylène-glycol n'a pratiquement pas avancé d'un iota en considérant un lot de 160 rats répartis sur 7 années, par rapport à un seul lot de 10 animaux convenablement étudiés."

Cela signifie qu'il est beaucoup plus important d'organiser convenablement une expérience sur un petit nombre de rats (plan factoriel par exemple), comme nous essayons de le faire habituellement, que de multiplier les animaux. L'étude de lots de dix animaux est largement suffisante, compte-tenu des variations expérimentales, pour conclure avec une confiance satisfaisante.

B) Structure et mécanisme des lésions glycoliques.

DAVID et UERLINGS (1964) ont étudié au microscope électronique l'infrastructure des reins de rats intoxiqués au glycol éthylénique pendant des durées variables. Ces auteurs n'ont pas trouvé de modifications essentielles au niveau des glomérules, mais surtout des lésions au niveau du tube contourné proximal. Dans la partie distale du tube, ils observent une augmentation de la teneur en liquide des cellules. Dans la partie proximale, ils observent en outre une multiplication des cytosomes (sous cette dénomination vague sont vraisemblablement inclus une bonne partie des lysosomes, microbodies, vacuoles d'absorption de la cellule tubulaire). En même temps, les cellules épithéliales formeraient des substances semblables à la membrane basale, ce qui entraîne un épaississement de la membrane basale tubulaire, avec souvent enclaves de particules de cytoplasme dans ces épaississements. Des lésions de dégénérescence et de régénérescence ont été également vues sur les cellules épithéliales. Les animaux (environ 180 g) ont reçu un ml/jour d'une solution à 50 p. 100 d'éthylène-glycol, par sonde oesophagienne. L'administration a été faite pendant un, deux, trois ou quatre jours. Malheureusement, les fixations effectuées par immersion de petits blocs dans de l'acide osmique à 1 p. 100 ne paraissent pas excellentes et de nombreuses causes d'erreurs interviennent dans l'interprétation, en particulier du gonflement cellulaire. C'est dans la région des replis cellulaires basaux du tube proximal, rarement élargis, que se constitue du matériel ayant l'aspect de membrane basale, montrant en infrastructure des aspects filamenteux. Ce matériel s'étend souvent depuis le noyau, parallèlement aux replis, jusqu'à la base cellulaire, où l'osmiophilie des substances formées augmente. La membrane basale est fortement épaissie (3000 - 7000 Å) et se retrouve souvent sous forme de bourgeonnements dans les cellules épithéliales. Nous n'avons jamais observé personnellement d'épaississement semblable dans les tubules. DAVID et UERLINGS signalent également la formation de grosses vacuoles dans le corps des cellules endothéliales des capillaires péri-tubulaires. Nous avons parfois rencontré cet aspect, mais il ne nous paraît pas évident qu'il s'agisse d'une lésion due à l'éthylène-glycol, et non pas d'un artefact de fixation ou d'un aspect normal dans certains capillaires.

DAVID et UERLINGS considèrent que les cytosomes observés sont en grande partie des lysosomes. Pour eux, les cristaux se formeraient par réunion des cytosomes. En ce qui concerne le mécanisme d'élimination de l'éthylène-

glycol, ces auteurs supposent que la filtration glomérulaire se fait sans altération au niveau du glomérule. L'action toxique ne se ferait qu'après admission du glycol dans la cellule tubulaire. Les cellules épithéliales du secteur proximal du tube contourné ont en effet des propriétés de résorption qui ont été prouvées pour les protéines, le bleu Trypan, la silice, etc... Les lysosomes interviennent évidemment dans cette résorption (voir : HOURDRY, 1968 ; STRAUS, 1967). Il est à noter que l'oxalose obtenue par l'éthylène-glycol se distingue de l'intoxication par l'acide oxalique. Pour cette dernière, il est vraisemblable que de l'oxalate de calcium est déjà éliminé par les glomérules. Il en résulte qu'il peut se former des cristaux à l'intérieur de la lumière tubulaire sans que la cellule soit nécessairement mise en jeu. Ce ne sera que secondairement que l'épithélium sera endommagé. Cependant, GALLE, après administration d'oxalate, a pu montrer la formation de cristaux intra-cellulaires dans le tube (1967). Cette interprétation est donc douteuse.

DAVID et UERLINGS admettent que le glycol éthylénique est réabsorbé par les cellules tubulaires et dégradé en cet endroit, soit en passant à l'acide glycolique, soit par l'acide glyoxylique ou par le glyoxal jusqu'à l'acide oxalique. C'est par ses liaisons intra-cellulaires avec des métaux comme le calcium et le magnésium, que l'acide oxalique semble provoquer les nécroses. Cependant, l'action nocive de l'éthylène-glycol est plus importante que celle de l'acide oxalique et conduit à des nécroses parfois très étendues de l'épithélium tubulaire. D'après FRIEDMAN l'acidose qui se constitue est d'une grande importance, car 3 à 10 p. 100 seulement de l'éthylène-glycol sont transformés en acide oxalique. D'autres auteurs maintiennent également que l'action toxique n'est pas due seulement à la formation d'acide oxalique. Il est difficile de savoir dans quel sens fonctionnent les cellules tubulaires, puisque des mouvements de liquide sont vraisemblables dans les deux directions, au niveau de l'apex de la lumière vers la cellule, et au niveau de la basale depuis les capillaires vers la cellule. Si la présence de la bordure en brosse ne laisse pas de doute quant au premier mécanisme, on a tendance actuellement à considérer de plus en plus le deuxième mécanisme. La présence de replis basaux importants au niveau du tube distal est favorable à cette hypothèse. Différents auteurs pensent qu'il existe au niveau de la membrane basale des systèmes utilisant des enzymes du type des adényl-cyclases, qui, en libérant de l'A.M.P. cyclique dans la cellule, joueraient un grand rôle dans le déclenchement des opérations métaboliques. Cependant, du fait que les cellules du tube distal sont peu altérées dans le cas de la néphrite à éthylène-glycol, on peut en conclure avec une certaine sécurité que c'est sans doute le premier processus (résorption à partir de la lumière) qui est essentiellement impliqué.

D'après DE DUVE (1966) des peroxisomes ont été trouvés d'abord dans le foie, puis plus tard dans le rein de Rat. Or, les peroxisomes contiennent des enzymes clés du cycle glyoxylique dans les semences en cours de germination.

LEGRAIN et Coll., (1966) discutent le rôle du calcium dans la pathogénie de l'oxalose chez l'Homme ; l'oxalose est une thésaurismose oxalique liée à une augmentation de la synthèse de l'acide oxalique, trouble héréditaire dont le mécanisme exact demeure encore mal élucidé. Il pourrait se faire que l'anomalie siège au niveau des voies de transformation de l'acide glyoxylique. La calciurie joue très probablement un rôle secondaire et contingent dans la pathogénie des troubles. L'excès de synthèse de l'acide oxalique entraîne une hyper-oxalurie qui est longtemps isolée. Mais l'oxalate de calcium a tendance à précipiter dans les voies excrétrices et dans les tubes. Secondairement, la précipitation intra-tubulaire et la lithiase, souvent infectée, favorisent l'apparition d'une néphropathie interstielle. Celle-ci s'oppose à l'excrétion rénale de l'acide oxalique et tend à élever la concentration sanguine. Par voie de conséquence, l'hyperoxalémie favorise la

précipitation de cristaux d'oxalate dans les différents viscères et en particulier dans le rein. Cette précipitation rénale contribuant à aggraver la néphropathie, il se produit un véritable cercle vicieux qui explique parfaitement la rapidité d'évolution de l'insuffisance rénale, une fois celle-ci apparue.

C) Comparaison avec d'autres lésions de calcification rénale

GALLE (1967) a étudié, grâce au microscope électronique, et à la microsonde de Castaing, la localisation de différents dépôts calciques dans la cellule rénale. Avec la surcharge en ion oxalate, il a trouvé des cristaux fortement biréfringents en lumière polarisée, et donnant des réactions de VON KOSSA, de STOELZNER et au carmin de SHULTZ, négatives. En coupes épaisses, il a montré que ces cristaux n'ont pas de forme géométrique définie, que leur localisation est intra-cytoplasmique, et qu'aucune membrane ne sépare le dépôt anormal du cytoplasme adjacent. A l'intérieur du cytoplasme la cristallisation semble s'effectuer au hasard; aucun rapport particulier avec un quelconque organite intra-cytoplasmique n'a pu être mis en évidence et les cristaux ne sont pas intra-vacuolaires.

Avec une surcharge en ion phosphate, on trouve dans les cellules tubulaires de petites inclusions intra-cytoplasmiques de dimension généralement inférieure au micron, d'aspect cristallin et de très forte densité. Ces inclusions siègent dans la matrice cytoplasmique fondamentale dont elles ne sont séparées par aucune membrane. Elles n'ont aucun rapport particulier avec un organite intra-cytoplasmique quelconque. Leurs dimensions sont beaucoup plus petites que celles des inclusions d'oxalate de calcium.

Lors de la surcharge expérimentale en gluconate de calcium, on trouve deux types de dépôts : les plus importants siègent dans les basales des tubes proximaux, ou plus rarement dans les basales de la capsule de Bowman. Leur structure est finement granulaire, et ils sont disposés en couches concentriques. Un deuxième type de dépôts, beaucoup plus rares, est au contraire intra-cellulaire et siège en plein dans la matrice cytoplasmique fondamentale des cellules glomérulaires viscérales et des cellules des tubes proximaux.

Lors de l'intoxication par la vitamine D₃, on trouve une néphrocalcinose extrêmement importante ; les dépôts siègent autour des tubes et prennent fortement la coloration de Stoelzner. Leur aspect est à peu près identique à celui des dépôts provoqués par la surcharge en calcium, mais leur topographie est différente : au lieu d'être localisés au pourtour des tubes proximaux, on en trouve en grande quantité autour des autres portions des tubules et notamment autour de la médullaire. De plus, il existe des lésions parenchymateuses très importantes, en particulier au niveau du glomérule. Leur ultrastructure est formée par l'association de petits grains arrondis siégeant dans les membranes basales des tubes ; on n'y trouve aucune image concentrique.

La carence expérimentale en magnésium produit des lésions caractéristiques au niveau du rein. BATTIFORA, EISENSTEIN, LAING et MAC CREARY (1966) indiquent que la lésion rénale primitive dans la carence en magnésium est un œdème de l'épithélium tubulaire, accompagné d'une augmentation de la quantité de calcium ionisé dans le cytoplasme. Ensuite, des cristaux d'apatite apparaissent dans la pars recta des tubes contournés proximaux, dans les anses de Henlé et les tubules collecteurs. Ces dépôts sont à la fois extra-cellulaires et intra-cellulaires et occasionnellement forment des amas. Les dépôts intra-cellulaires de calcium les plus précoces se forment dans le hyaloplasme ou dans les lysosomes. Par endroits, des augmentations localisées du nombre et du diamètre des lysosomes représentent peut-être une réponse du néphron aux dommages causés par les dépôts de calcium. La calcification des mitochondries n'a pas été observée, et des suspensions de mitochondries isolées ne montrent pas de changement dans leur con-

tenu calcique dans ces conditions. Par contre, la calcification mitochondriale se produit chez le Rat déficient en magnésium, dans les sarcosomes, c'est-à-dire les mitochondries musculaires ; elle se produit également dans les mitochondries rénales, dans la néphro-calcinose induite par la vitamine D ou par la parathyroïde. Lorsque du gluconate de calcium est administré par voie intra-veineuse, les membranes basales se calcifient seules.

SCHNEEBERGER et MORRISON (1965) ont étudié la néphropathie de la déficience expérimentale en magnésium chez le jeune Rat Wistar de 50 à 70 g. Dans ces conditions, la calcification rénale apparaît 4 à 6 jours après le début du régime déficient en magnésium ; elle est limitée à la bande interne de la zone externe de la médulla. Cette zone contient principalement la branche ascendante épaisse de Henlé et moins fréquemment la branche descendante fine. Le calcium est trouvé dans les cellules, dans des corpuscules du type lysosome et également libre dans le cytoplasme. La calcification cellulaire n'a jamais été trouvée en l'absence de calcium dans la lumière. L'apparition de dilatation des tubes proximaux et distaux représente probablement une hydro-néphrose interne, secondaire à la calcification et à la fibrose de la médulla. Bien que la déficience en magnésium s'accompagne d'une déplétion cellulaire en potassium (spécialement dans le muscle), il n'a pas été trouvé au niveau du rein de formation de lysosomes dans les cellules de la zone papillaire, qui est caractéristique de la déficience en potassium chez le Rat (MORRISON, PANNER et GASIC, 1963).

D) Le rôle de l'ion calcium dans les lésions dues à l'éthylène-glycol.

Nous avons noté dans plusieurs expériences que la calcémie s'élève notablement au cours de l'intoxication par l'E.G. (DEBRAY et Coll., 1963 a, 1964).

TANRET et Coll. (1962) ont constaté, dans cette même intoxication chez le Rat, une augmentation considérable du calcium rénal. Peut-être faut-il rapprocher ces observations expérimentales de certaines constatations cliniques ; c'est ainsi que THOMAS et Coll. (1962), chez des patients atteints de lithiase calcique, ont découvert deux fois sur trois cas des signes d'ostéoporose et trois fois sur quatre, des signes d'ostéomalacie ; c'est ainsi que LICHTWITZ, DE SEZE et Coll. (1963) ont insisté sur les perturbations de la calciurie au cours des néphrites chroniques et au cours du diabète calcique avec ou sans lithiase.

Le mécanisme de l'hypercalcémie de la lithiase oxalique à l'E.G. est mal élucidé : destruction osseuse libérant du calcium ? accroissement de la réabsorption tubulaire calcique par les tubules lésés ?

D'après MILLIEZ, LAGRUE et Coll. (1960), le rôle solubilisant de colloïdes dits "protecteurs" n'a pas été confirmé. La solubilité des sels de calcium est identique dans les urines totales et les filtrats urinaires. Par contre, les agents à action complexante ou à action hydrotropique ⁽¹⁾ ont un rôle essentiel.

Certains acides organiques faibles donnent avec l'ion calcium des sels solubles non ionisés. Il en est ainsi du citrate de calcium. La présence d'acide citrique dans l'urine favorise donc certainement la solubilité des sels de calcium. Les agents complexants synthétiques tel le tétracémate semblent avoir une action analogue, mais mal précisée. Vis-à-vis de l'ion calcium, l'acide glycuronique paraît particulièrement actif. En présence de glycuronides complexes, la solubilité du phosphate de calcium se trouve nettement augmentée. Il est donc permis de penser que les glycuronides urinaires interviennent dans la solubilité des sels de calcium dans l'urine. Ceci semble confirmé par le fait qu'il existe chez les sujets atteints de coliques néphrétiques avec hypercalciurie et de lithiase rénale calcique une augmentation indiscutable de l'excrétion d'acide glycuronique urinaire en dehors même de toute administration médicamenteuse.

(1) Le terme d'hydrotropie a été proposé pour décrire l'action solubilisante de certains sels organiques.

Les ions calcium possèdent chez le Rat une forte action diurétique et natriurétique (FULGRAFF et Coll., 1968). Chez le Chien, l'augmentation de débit urinaire est également évidente. La perfusion de chlorure de calcium chez le Rat entier, ou sur le rein de rat perfusé isolé, amène des augmentations de débit urinaire allant jusqu'à 10 fois et une élimination de sodium atteignant 15 fois les valeurs de base. Le taux de filtration glomérulaire n'est que peu modifié en moyenne: il n'augmente jamais de plus de 50 p. cent. La pression artérielle n'est pas modifiée non plus. Bien que le calcium présent dans l'urine éliminée soit augmenté au détriment du sodium, la réabsorption du sodium est nettement diminuée, en pourcentage de la quantité filtrée. Ceci permet de conclure que les ions calcium exercent chez le Rat une action diurétique et natriurétique par intervention tubulaire directe. Ce fait est peut-être à rapprocher de la compétition entre les ions sodium et calcium qui se manifeste au niveau de la membrane dans le muscle cardiaque (LANGER, 1968). Par ailleurs, WHITTEMBURY et Coll.(1960) ont rapporté que l'ion calcium modifiait le rayon équivalent des pores aqueux dans le rein de Necturus.

Quoiqu'il en soit, on peut imaginer dans nos conditions expérimentales que la présence de substances complexant le calcium puisse intervenir d'une façon ou d'une autre dans la gravité des lésions. Une certaine action complexante a été envisagée pour les polymères et nous nous sommes proposé de rechercher expérimentalement l'importance du facteur complexation dans les lésions d'oxalose obtenues. A cet effet nous avons organisé une expérience visant à étudier un agent complexant classique, l'acide éthylène diamine tétracétique (E.D.T.A., complexon III). Etant donné les incertitudes concernant l'effet sur l'absorption du calcium, nous avons essayé simultanément le complexon par voie buccale et par voie intramusculaire.

1.— Organisation de l'expérience.

Les animaux ont été répartis comme suit :

- 1/ 10 rats témoins,
- 2/ 10 rats buvant une solution à 2 p. 100 d'E.D.T.A. (sel disodique),
- 3/ 10 rats recevant 3 injections IM. par semaine de 50 mg/kg d'E.D.T.A. (en solution à 0,5 p. 100 dans ClNa 7 p. 1000) ; boisson OH₂,
- 4/ 10 rats buvant EG à 1 p. 100,
- 5/ 10 rats buvant le mélange EG 1 p. 100 + E.D.T.A. 2 p. 100,
- 6/ 10 rats buvant EG 1 p. 100 et recevant 3 fois par semaine 50 mg/kg d'E.D.T.A. IM.

Après une période d'observation de quinze jours, les traitements ont duré 18 jours. Les principaux résultats sont résumés dans les tableaux LXIX et LXX.

RESULTATS

a) Mortalité : Elle se décompose comme suit : EG 2/10 ; EG + complexon I.M. : 1/10. Mais il faut noter que l'on a observé une certaine mortalité pendant la période d'observation (2/10 et 2/10 dans les lots qui recevront ultérieurement complexon I.M. et complexon buccal), qui n'est donc pas imputable au traitement.

b) Boisson : elle est particulièrement importante à considérer dans cette série. L'éthylène-glycol augmente légèrement la consommation journalière, et le complexon I.M. semble dépourvu d'action. Par contre, le complexon buccal semble très mal accepté par les animaux, et la quantité de liquide absorbée diminue légèrement dans le lot complexon buccal seul, et très fortement dans le lot recevant EG + complexon buccal. Les quantités calculées d'EG et complexon dans les différents lots se présentent comme suit (moyenne totale par rat au cours de l'expérience) :

TABLEAU LXIX : Action du complexe associé à l'éthylène-glycol (croissance, boisson, calcium, urée) - Série AI.

Grandeurs étudiées	MOYENNES					TESTS DE SIGNIFICATION				
	T	C bucc.	C I.M.	EG	EG + C.bucc.	EG + C I.M.	EG	C.bucc.	C. I.M.	EG/C.bucc./C.I.M
Pds début observation (g)	277	288	266	282	292	281		NS		
Pds début traitement (g)	316	356	329	328	338	317		NS		
Pds au sacrifice (g)	345	326	343	306	239	306	0,001	0,01	NS	NS
Calcémie (mg/l)	93,4	88,8	88,7	102,2	91,1	94,2	0,05	NS	0,05	NS
Urée (cg/l)	33,0	43,7	37,1	81,8	58,7	98,1	0,001	NS	NS	NS
Boisson (ml/rat/jour)	29,7	22,5	31,1	36,5	9,5	38,4	0,001	0,01	NS	NS

TABLEAU IXX : Action du complexe associé à l'éthylène-glycol (Poids des organes) - Série AI.

Grandeurs étudiées	MOYENNES					TESTS DE SIGNIFICATION				
	T	C. bucc.	C. I.M.	EG	EG + C. Bucc.	EG + C. I.M.	EG	C. Bucc.	C. I.M. EG/C. bucc/EG/C I.M.	
Reins (cg)	169 (162)	195 (186)	190 (184)	346 (350)	148 (175)	314 (323)	0,001	NS	NS	NS
Rate (mg)	524 (482)	452 (431)	440 (425)	581 (568)	237 (305)	449 (472)	NS	NS	NS	NS
Coeur (mg)	892 (859)	836 (794)	907 (878)	839 (859)	620 (749)	775 (820)	NS	NS	NS	NS
Surrénales (mg)	40,2	37,7	44,0	66,1	43,0	45,8	0,05	NS	NS	NS
Foie (cg)	819 (781)	757 (708)	792 (759)	667 (704)	461 (598)	673 (720)	0,01	NS	NS	NS

- 2/ Complexon buccal : 6,3 g,
- 5/ Complexon buccal : 2,7 g + EG 1,35 ml,
- 4/ EG seul : 5 ml,
- 3/ Complexon I.M. : 350 mg/kg (en 7 injections),
- 6/ Complexon I.M. : 350 mg/kg + EG 5,35 ml.

Ces chiffres ont pour conséquence que le lot EG + complexon buccal a absorbé très peu d'EG. Nous avons vu précédemment que l'intensité de la lithiase est relativement indépendante de la quantité d'EG absorbée, mais ici nous sortons vraisemblablement des limites d'indépendance, et en tout cas des expériences déjà obtenues avec EG seul (minimum 2,9 ml).

c) Effets du complexon buccal : Nous n'examinerons pas en détail tous les résultats, mais seulement les actions qui apparaissent significatives. Le complexon buccal produit un amaigrissement, aussi bien lorsqu'on l'emploie seul qu'en association avec l'EG ; dans ce dernier cas, l'effet est cependant plus marqué, en raison de l'addition avec l'effet propre de l'EG. Le poids des reins et l'urée restent sensiblement normaux pour l'association EG + complexon buccal ; le poids de la rate y est significativement diminué (ce que nous expliquons mal pour l'instant). La lithiase est nulle avec l'association : aucune cristallisation n'est observée à l'histologie ; tous les organes sont normaux.

Cette protection contre l'oxalose est très vraisemblablement due en majeure partie à la faible quantité d'EG consommée. Des expériences de contrôle sont en cours.

d) Effets du complexon intra-musculaire :

Le complexon I.M. n'a pas d'action sur la croissance ; il diminue la calcémie (comme d'ailleurs le complexon buccal) alors que l'EG augmente légèrement cette grandeur, sans qu'une interaction se manifeste entre les deux facteurs. Pour toutes les autres grandeurs étudiées, le complexon I.M. ne modifie pas les effets de l'EG. La lithiase observée à l'histologie vaut : 1 0,3 +, 2 ++ et 3 +++ ; dans le lot EG seul : 1 + 5 ++ et 1 +++ . Compte-tenu de l'imprécision de l'estimation et l'irrégularité des réponses, il est raisonnable de conclure à une similitude des deux lots d'animaux.

DISCUSSION :

a) Toxicité du complexon I.M. : L'injection rapide (20 s) de 100 mg d'E.D.T.A. sodique dans la veine marginale de l'oreille d'un lapin provoque la mort rapide de l'animal en tétanie hypocalcémique. Si du calcium est injecté simultanément, l'animal ne meurt pas. Chez la Souris, l'E.D.T.A. peut entraîner la mort s'il est injecté rapidement par voie intra-péritonéale (50 à 250 mg/kg suivant la vitesse). En doses fractionnées I.P. les animaux supportent jusqu'à 350 mg/kg pendant six jours consécutifs.

FOREMAN (1955) donne les chiffres de toxicité suivants, pour des injections parentérales rapides chez le Rat : 300 mg/kg (I.P.), 55 mg/kg (I.V.), 600 mg/kg (I.M.). Les doses que nous avons employées paraissent donc peu toxiques. Chez l'Homme, la toxicité paraît faible également, pourvu que les injections intraveineuses soient lentes : 1 à 4 g par jour sont bien supportés pendant plusieurs jours (SPENCER, 1960).

b) Toxicité orale - Absorption du calcium :

Par voie orale, le Rat supporte 0,5 p. 100 d'E.D.T.A. dans la provende sans modifications apparentes sur trois générations. Avec 5 p. 100 d'E.D.T.A. sodique, les animaux sont atteints de diarrhée chronique, leur croissance est plus lente et ils sont plus petits que les animaux témoins, mais leur longévité n'est pas modifiée. Une dose de 2 p. 100 dans la boisson n'est donc pas exagérée. Il semble que l'E.D.T.A. soit éliminé presque entièrement par les fèces. L'E.D.T.A.

sodique réagit sans doute avec les sels alcalino-terreux du bol alimentaire et les chélates de calcium et de magnésium formés ne franchissent pas la paroi intestinale. On peut donc en déduire que la tolérance des animaux à l'E.D.T.A. sodique sera d'autant plus grande que le régime sera plus riche en sels minéraux.

Dans notre expérience, on pourrait envisager une moindre absorption du calcium, conduisant à une plus difficile précipitation tissulaire de son oxalate. Cependant, la calcémie n'est pas modifiée davantage que par l'E.D.T.A. intra-musculaire, qui n'empêche pas les calcifications.

c) Lésions rénales par l'E.D.T.A. :

L'effet toxique principal de l'E.D.T.A. porte sur le rein (ALTMAN, 1962) ; une dégénérescence grave des tubules proximaux a été observée, parfois avec destruction presque totale de l'épithélium tubulaire proximal, chez le Rat et chez l'Homme. Les effets sont habituellement réversibles.

L'étiologie de ces altérations rénales n'est pas évidente, mais on peut évoquer une interprétation : l'administration d'E.D.T.A. produit une élimination accrue de nombreux métaux sous forme de chélates. De fortes quantités de ces chélates passent à travers l'épithélium du tube au cours d'une période relativement courte, car l'E.D.T.A. est très rapidement éliminé. Comme tous les chélates métalliques sont plus ou moins dissociés *in vivo*, la cellule se trouve exposée à une concentration anormalement élevée, et donc toxique, d'ions métalliques. Ceci peut être dû à une compétition pour le métal de ligands physiologiques, ou à des variations de pH dans la cellule ou dans le lumen tubulaire. Notons que l'augmentation du pH urinaire par administration de bicarbonate ne diminue pas la toxicité rénale de l'E.D.T.A. calcique chez le Rat. Les changements tubulaires ressemblent à ceux que l'on observe dans les intoxications mercurielles, et on peut penser que la toxicité est due à des interférences ion-métal dans des systèmes enzymatiques cellulaires sensibles, surtout que certains métaux peuvent encore exercer leurs effets sur les processus enzymatiques sous forme de chélates.

Arguments thérapeutiques : Chez l'Homme, l'emploi de perfusions rétrogrades d'E.D.T.A. pour la dissolution des calculs pyéliqués ne semble pas avoir donné de résultats très spectaculaires. Pratiquement, cette substance s'est surtout révélée favorable dans le traitement de l'intoxication saturnine professionnelle sous forme d'E.D.T.A. calcique (PERRAULT et Coll., 1956). En dehors de cela, l'E.D.T.A. sodique a été proposé avec plus ou moins de succès pour le diagnostic de l'hypoparathyroïdie, le traitement des arythmies par intoxication digitale, la porphyrie, la sclérodémie, l'hypercalcémie (in GOODMAN et GILMAN, 1965). La complexation calcique par des produits de ce type ne semble donc pas de première importance dans le déterminisme des lésions rénales.

E) Spécificité des lésions rénales obtenues par les polymères :

Les lésions obtenues dans les associations EG-polymères sont-elles bien spécifiques des polymères, et ne correspondent-elles pas à une simple aggravation de la néphrite glycolique ?

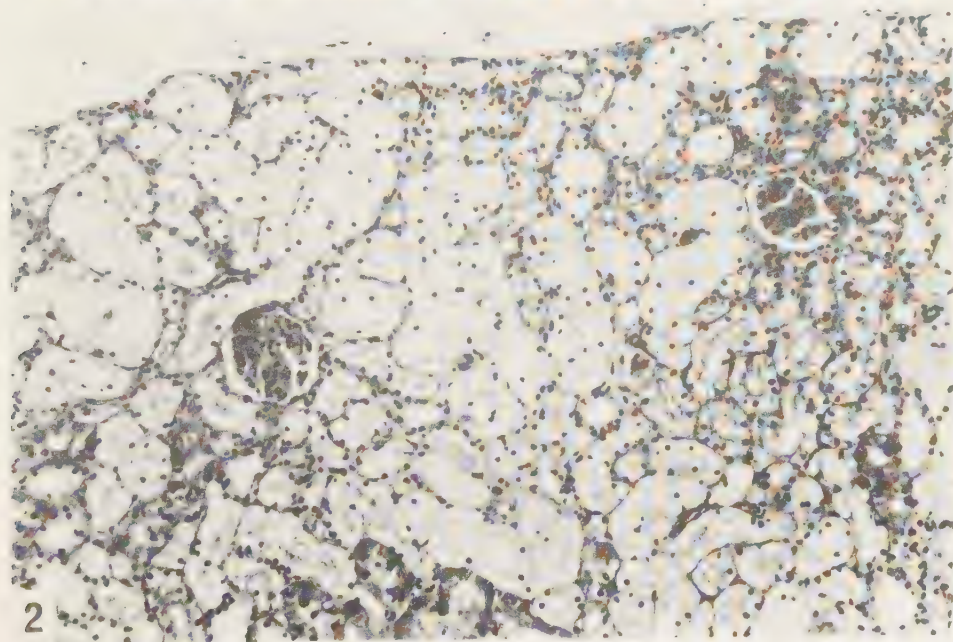
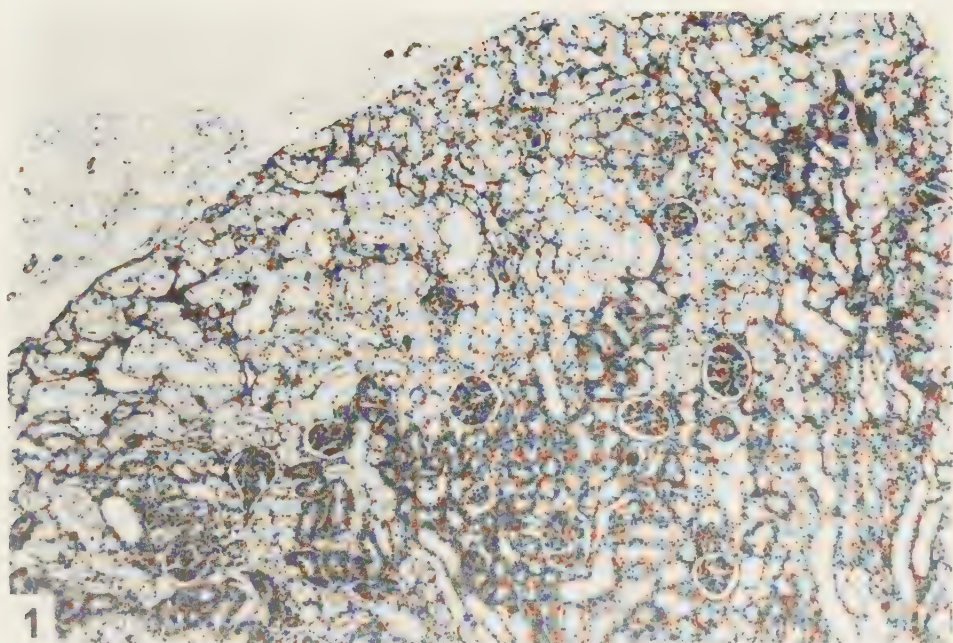
La dilatation tubulaire n'est pas spécifique, car elle est observée à un degré plus ou moins fort dans les séries soumises à l'E.G. seul, lorsque la lithiase est importante. On peut supposer que cette dilatation est mécanique, sur un obstacle plus ou moins bas situé, et constitué par des cristaux présents dans la lumière du tube.

Par contre, divers arguments montrent que les aspects de clarification sont bien dûs aux polymères. Tout d'abord, les figures 36 et 37 montrent que la clarification s'observe nettement dans les séries EG/polymère, parfois légèrement dans les séries polymère seul, jamais dans les séries EG seul.

TABEAU LXXI Interaction du PF-68 avec un régime riche en citrates.

Grandeur étudiée	VALEURS MOYENNES			TESTS DE SIGNIFICATION	
	Témoins	Citrate	Citrate + PF-68	Effet du citrate	Effet de l'association PF-68/citr.
Poids début citrate (g)	446	460	445	- NS entre groupes	-
Poids début PF-68 (g)	454	410	390	↘ 0,05	-
Poids sacrifice (g)	464	370	296	↘ 0,001	↘ 0,001
Urine (ml/rat/jour)	23,8	28,9	20,3	↗ 0,05	↘ 0,01
Urée (cg/l)	44,0	47,5	82,8	NS	↗ 0,001
Surrénales (mg)	48,5	45,1	46,2	NS	NS
Citrate (mg)	656 (589)	546 (516)	483 (523)	NS	NS
Coeur (mg)	1.038 (910)	911 (854)	782 (856)	NS	NS
Reins (cg)	212 (186)	195 (183)	240 (254)	NS	NS
Foie (cg)	1.245 (1.106)	802 (740)	781 (861)	↘ 0,001	NS

FIGURE 43 - Aspects de clarification tubulaire provoqués par l'association PF - 68 9 inj. + régime citraté 4 semaines. Dans certains secteurs tubulaires, les cellules perdent complètement leur colorabilité ; certaines sont complètement vacuolisées. Ces images sont très semblables à celles données par l'association PF 68 + éthylène glycol (fig. 38), mais sans cristaux (1 : 25 x ; 2 : 70 x).



D'autre part, dans le cas du PF-68, nous avons pu obtenir des aspects tout à fait comparables au cours d'une expérimentation complètement différente, ne mettant pas en jeu l'EG. Dans cette expérience, en effet, nous recherchions les modifications métaboliques produites dans divers organes, et au niveau du rein en particulier, par l'administration au Rat d'un régime riche en citrates (1), (DEBRAY et Coll., 1968). Simultanément nous avons organisé une partie de l'expérience pour voir si ces modifications métaboliques monteraient une interaction avec le PF-68 (6 inj. I.M. de 1,6 g/kg, à raison de 2 injections par semaine). Cette partie d'expérience est résumée dans le tableau LXXI.

On y observe que le citrate seul donne un amaigrissement, renforcé significativement par l'adjonction de PF-68 ; l'urée est nettement plus forte avec l'association citrate/PF-68, les reins légèrement plus gros, sans que cette variation soit significative ; le citrate donne une diminution du poids du foie, non modifiée par PF-68. Surtout, les résultats de l'histologie montrent 9 fois sur 9 au niveau du rein, des aspects de clarification tubulaire : 4 +, 3 ++, 1 +++ et 1 +++, avec l'association citrate/PF-68.

La figure 43 montre un de ces aspects et prouve son analogie totale avec les lésions rencontrées dans les associations EG/PF-68.

On peut donc conclure que ces aspects sont bien dûs aux polymères, et qu'ils semblent pouvoir apparaître lors d'une altération quelconque de la fonction rénale, cette altération se trouvant immédiatement potentialisée par la présence du polymère. C'est pourquoi il est particulièrement intéressant de rapprocher ces aspects des lésions dites de "néphrose osmotique" observées chez l'Homme dans diverses circonstances, mais spécialement après perfusions de Dextran 40.000 (voir plus loin).

F) Comparaison avec d'autres polymères.

1.— Résultats personnels :

Dans d'autres expériences de lithiase expérimentale, nous avons recherché l'influence d'autres polymères sur les lésions rénales. Nous rappellerons seulement ici les principaux résultats ainsi acquis.

a) PVP 40.000 :

Nous avons utilisé de la PVP pour usage médical, de fabrication Spécia (Subtosan), dont le P.M. se situe aux alentours de 37.000 à 38.000. La dose administrée était de 1 ml de solution à 3,5 p. 100 de PVP, en I.M., 6 fois par semaine, 14 injections au total. Dans ces conditions, les données biologiques et histologiques sont identiques à celles constatées chez les animaux recevant uniquement de l'éthylène-glycol. Le polymère est donc parfaitement toléré dans ces conditions (DEBRAY et Coll., 1963 b).

b) Dextran 75.000 :

Nous avons utilisé du Dextran ou D-glucosane hautement polymérisé, de poids moléculaire 75.000 environ. La dose administrée était de 1 ml de Dextran à 6 p. 100 en I.M., 6 fois par semaine, à raison de 18 injections au total. On observe dans ces conditions que la mortalité n'est pas augmentée par rapport à l'EG seul, et que la perte de poids est un peu plus élevée. A l'histologie, les rates présentent d'importantes modifications : elles contiennent une grande quantité de macrophages à cytoplasme spumeux prenant la coloration de Hotchkiss. Cet aspect est à rapprocher de la mise en évidence par BULL (in BOURILLON, 1953) de Dextran dans la rate des animaux à qui l'on a injecté pendant quelque temps

(1) Formule du régime employé : Aliment complet en poudre pour rats (U.A.R.) : 800 g ; citrate monopotassique : 75 g ; citrate monosodique : 75 g ; acide citrique : 50 g.

ce produit.

Au niveau du rein, les lésions sont marquées et très particulières. La lithiase est plus importante. Il y a une néphrite tubulaire assez considérable sans clarification. Surtout on note une néphrite interstitielle considérable, quasiment mutilante, avec formation de zones fibroblastiques denses, parsemées de nombreux foyers macrophagiques, parfois centrées par des plages d'une substance homogène vivement colorée en rouge par la leucofuchsine. Cette réaction conjonctive quasi tuberculoïde a été uniquement observée avec l'E.G. + Dextran. Elle doit être distinguée de la réaction macrophagique à cellules géantes décrites avec l'E.G. seul, laquelle apparaît dans les tubes au contact des cristaux d'oxalate de calcium quand l'intoxication, poursuivie pendant 2 ou 3 semaines, est arrêtée pendant quelques jours.

c) Tween 80 :

Le Tween 80, ou monooléate de polyoxyéthylène sorbitan, d'un poids moléculaire de 1300 environ, est un agent tensio-actif vigoureux. Il a été administré à la dose de 0.65 g/kg sous forme de soluté à 20 p. 100, I.M. 6 fois par semaine. La durée d'expérience est variée : 18 à 42 jours, ce qui fait que les animaux ont reçu de 10,4 à 23,4 g/kg de Tween (DEBRAY et Coll., 1964).

La perte de poids est plus forte qu'avec l'E.G. seul. Les rats recevant du Tween seul boivent moins que les témoins, et avec l'association Tween + E.G., la boisson revient au voisinage de la normale (elle est augmentée par l'E.G. seul).

Les reins sont un peu plus gros qu'avec l'E.G. seul ; les surrénales sont légèrement augmentées. A l'histologie, le Tween seul ne donne aucune anomalie rénale décelable, tandis que l'association Tween + E.G. donne une clarification des cellules tubulaires, qui ont un aspect clair, spongieux à limites cellulaires nettes, ce qui donne aux reins un aspect quasi "végétal". Ces lésions sont comparables à celles que fournit l'association E.G. + PF-68 (DEBRAY et Coll., 1964). Les autres organes ne sont pas modifiés. Au point de vue des éléments figurés du sang, l'association E.G. + Tween produit une leucocytose très élevée au bout d'une semaine, qui porte essentiellement sur les polynucléaires neutrophiles.

d) Méthylcellulose (MC 200) :

La méthylcellulose 200 (1) a été injectée en I.M. sous forme d'une solution aqueuse à 1 p. 100 à raison de 0,8 ml/100 g de rat, soit 0,08 g/kg de MC 200 par injection, 2 fois par semaine, à raison de 5 injections au total. Dans cette expérience (série AA), un lot était traité parallèlement au PF-68 pour comparaison. La mortalité était de 1/10 pour E.G. seul, 1/10 pour PF-68 seul, 1/10 pour MC 200 seule, 3/10 pour EG + MC 200, 5/10 pour EG + PF-68. La MC 200 ralentit la croissance ($P = 0,01$), mais moins que le PF-68 aux doses employées. MC 200 seule augmente légèrement le poids des reins ($P = 0,05$) ; cet effet est additif avec celui de l'E.G., mais il n'y a pas d'interaction, contrairement à ce qui se passe pour le PF-68 (inédit).

MC 200 seule donne une légère congestion vasculaire au niveau des glomérules. La lithiase est forte avec E.G. + MC 200 ; on ne note pratiquement pas d'aspects de clarification ; il n'y a pas de lésions glomérulaires.

2.- Données de la littérature .

a) PVP : En ce qui concerne la toxicité de la polyvidone, qui, dans certains cas a donné des accidents hépatiques et rénaux, nous rappellerons l'étude de l'action cancérigène chez le Rat de HUEPER (1956) et en sens contraire la diminution de l'action cancérigène du 3-4 benzopyrène chez le Rat sous l'influence de la polyvidone (CHEVALLIER - 1961).

(1) Viscosité 200 centipoises - Ets LASERSON - SABETAY.

SCHMUTZLER et Coll., (1966) ont étudié l'effet de la PVP (Périston NJ) chez des rats présentant des lésions rénales expérimentales. Des rats mâles Wistar ont été traités d'une part par la technique de MASUGI avec du sérum anti-rein, d'autre part par intoxication aiguë au chlorure mercurique. Dans le cas de la néphrite de MASUGI à un degré faible ou moyen, la PVP n'a pas d'influence sur la mortalité, le temps de survie, les courbes de poids, ou sur l'élimination d'électrolytes ou d'albumine par l'urine. Lors de l'administration d'une dose forte de sérum anti-rein (à la suite de laquelle tous les animaux moururent), il intervient cependant lors du traitement à la PVP, un raccourcissement significatif de 3 à 5 jours du temps de survie. Ce raccourcissement n'est pas dû à un renforcement de l'insuffisance rénale, car la rétention de substances normalement éliminées par voie urinaire, la clearance de l'inuline, ou du rouge de phénol, n'ont pas été modifiées par la PVP, par rapport aux témoins. L'action de la PVP au cours de l'intoxication au chlorure mercurique est également faible. La mortalité, la rétention azotée et les fonctions rénales n'ont pas été influencées par les administrations de PVP. Toutefois, SCHMUTZLER et Coll., trouvent au cours de l'examen histologique des reins des lésions de néphrose osmotique sous l'influence de la PVP. Mais ces auteurs ne tiennent pas compte de ces lésions en considérant qu'elles n'ont aucune importance essentielle sur la fonction rénale. Ils citent également les résultats de MENG et WIRTH (1965) qui ont contrôlé l'effet de la PVP. sur la fonction rénale de rats néphrectomisés à 50 - 70 pour cent ou ayant une néphrose au dihydrotachysterol. Ces auteurs n'ont pas relevé de différence dans les clearances de l'inuline et du P.A.H. chez des animaux traités soit à la P.V.P., soit au chlorure de sodium isotonique. Ils ont par contre observé chez les rats atteints de néphrite de MASUGI et traités par la P.V.P., des altérations au niveau des poumons et du muscle cardiaque, qu'ils ne décrivent pas en détail.

b) Dextran :

La toxicité du Dextran a fait l'objet d'un grand nombre de travaux, résumés dans l'ouvrage de GRONWALL (1957). Depuis sa publication, on a en outre signalé que l'emploi du produit à forte dose comme anticoagulant avait provoqué plusieurs cas d'alopécies sévères (MEYLER, 1960).

PARKINSON (1967) rapporte que l'administration orale de Dextran conduit à une augmentation précoce du taux de glucose sanguin et du glycogène hépatique chez le Rat et chez l'Homme. C'est là probablement le résultat de l'hydrolyse du Dextran en glucose par les enzymes intestinaux. Par contre, le D.E.A.E. Séphadex A 25 n'est pas significativement affecté dans la lumière intestinale.

SCHULZE et LOWE (1967) trouvent que le traitement de rats avec du Dextran de poids moléculaire 65.000 provoque, après arrêt de la médication au 51ème jour, des altérations des enzymes hépatiques, qui se traduisent par une dégradation diminuée de l'hexobarbital, ce qui s'exprime par un temps de sommeil prolongé. L'examen histologique montre dans le foie et la rate une hypertrophie des cellules du système réticulo-histiocytaire. La microscopie électronique montre dans ces cellules des phagosomes avec du matériel osmiophile, que les auteurs interprètent comme du Dextran phagocyté. De plus, les cellules parenchymateuses du foie des animaux traités présentent des inclusions cytoplasmiques osmiophobes multiples que les auteurs interprètent également comme des inclusions contenant du Dextran. Deux mois après l'arrêt du traitement, les lésions histologiques sont toujours identiques. Les reins restent par contre normaux.

GAUDIANO, TARTARINI et PETTI (1967) ont étudié par des méthodes biochimiques les modifications du foie de Rat traité par du Dextran 75.000. Pour rechercher les altérations des lysosomes, ces auteurs ont d'une part déterminé les activités hydrolasiques totales sur le broyat de foie (cathepsine, phosphatase acide, beta-glycuronidase), d'autre part, dosé les mêmes activités sur le surna-

geant après une ultra-centrifugation permettant de séparer la fraction lysosomiale. Les enzymes lysosomiaux sont normalement présents dans le culot de centrifugation et peu actifs dans le surnageant. Dans leurs conditions expérimentales, GAUDIANO et Coll. ne trouvent pas d'augmentation de poids du foie, contrairement à des travaux précédents comme ceux de EGER et SCHULZE. Les activités totales des enzymes lysosomiaux sont peu modifiées par le traitement au Dextran, excepté une petite baisse de la bêta-glycuronidase. Par contre, les activités insédimentables des enzymes lysosomiaux apparaissent nettement et simultanément augmentées, ce qui indique un état de souffrance des lysosomes hépatiques, pouvant être mis en rapport avec les observations histologiques d'autres auteurs, comme EGER, qui trouvent tout un ensemble de phénomènes de régression des cellules parenchymateuses. La glucose 6 phosphatase, enzyme caractéristique du réticulum endoplasmique, n'est pas modifiée. Ceci permet à GAUDIANO et Coll. d'avancer une interprétation selon laquelle les altérations lysosomiales seraient un phénomène précoce dans les altérations cellulaires, et précèderaient l'altération de la perméabilité et du fonctionnement du réticulum endoplasmique et des mitochondries, qui participeraient seulement ensuite au processus de nécrose cellulaire.

Dans un autre travail, les mêmes auteurs (GAUDIANO et Coll., 1967) ont étudié l'effet de l'association de chlorpromazine au Dextran. Ils trouvent que dans ces conditions les activités hydrolytiques insédimentables sont plus faibles avec l'association Dextran-chlorpromazine qu'avec le Dextran seul. La chlorpromazine seule produit une baisse de ces activités en-dessous des valeurs témoins. La chlorpromazine paraît pourvue d'une action stabilisatrice sur la membrane des vacuoles phagocytiques, évitant la libération dans le milieu cellulaire d'enzymes attaquant les principaux constituants de la cellule. Ceci confirme les travaux d'EGER et SCHULZE (1965) qui avaient observé que les lésions histologiques produites par de fortes doses de Dextran sur le parenchyme hépatique étaient diminuées par l'administration simultanée de chlorpromazine. Il est à noter que, au niveau de la glucose-6-phosphatase, c'est-à-dire du réticulum endoplasmique, l'association Dextran + chlorpromazine donne une diminution d'activité, ce qui est un signe de souffrance; ce signe n'est observé ni avec le Dextran seul, ni avec la chlorpromazine seule.

La chlorpromazine pourrait donc exercer une action lésante sur le réticulum endoplasmique lorsque la cellule hépatique est déjà dans des conditions de souffrance.

DAVIES, RICKETTS et WILLIAMS (1963) ont injecté au Chien des quantités importantes d'une solution de Dextran 40.000 à 10 p. 100.

L'injection est faite en trois minutes et l'expansion initiale du volume de plasma est environ le double du volume de solution injectée. Ceci signifie qu'un appel d'eau supplémentaire a lieu des espaces extra-cellulaires vers le plasma. Puis le volume du plasma tombe rapidement (demi-vie d'environ 2 heures) alors que la concentration du Dextran chute plus lentement (demi-vie : environ 4,5 heures). Au bout de 5 à 6 heures 40 p. 100 du Dextran infusé sont excrétés, 20 p. 100 sont intra-vasculaires et les 40 p. 100 restants sont probablement extra-vasculaires. Les propriétés rhéologiques du sang sont modifiées par le Dextran (GREGERSEN, PERIC, USAMI et CHIEN, 1963). Toutes les fractions essayées, dont les poids moléculaires moyens vont de 15.000 à 250.000, augmentent la viscosité du sang, l'augmentation étant en relation avec le poids moléculaire moyen. Cet effet ne peut pas être expliqué par le changement de viscosité du plasma. Les auteurs ont également trouvé que l'osmolarité des solutions des fractions 15.000 et 45.000 était très en excès des valeurs qu'on pouvait attribuer au Dextran seul (Osmomètre de FISKE). Les échantillons contenaient suffisamment de sodium pour expliquer 40 p. 100 de cette osmolarité.

La perfusion de solution de Dextran chez le Rat, provoque une diminution des taux sanguins de protéines, lipides, acides gras non estérifiés et du calcium. Il pourrait se faire que le rôle des protéines du plasma comme transporteurs de certains ions et métabolites intermédiaires ne soit pas pris en charge par le Dextran qui les remplace (TRINER et MRAZ, 1963).

MILNER (1963) a trouvé que le traitement des fibrocytes de Souris, de la souche EARLE 929 ne produisait pas de toxicité immédiate ni retardée. Ceci s'oppose aux constatations de POWELL (1961) qui avait trouvé dans des cultures de cellules HeLa, des lésions aiguës immédiates dans les cellules en voie de mitose, suivies deux semaines après par une toxicité retardée se manifestant par la dégénérescence des cultures.

Certains rats, et non tous, réagissent par une réaction anaphylactoïde inflammatoire à l'injection unique intra-péritonéale de Dextran ou de blanc d'oeuf. Il s'agit d'une libération de sérotonine et d'histamine. L'injection de Dextran intradermique augmente la perméabilité capillaire chez le Rat par un mécanisme mettant en jeu des substances autres que l'histamine et la sérotonine (BONACCORSI et WEST, 1963).

L'administration de Dextran à la dose de 300 mg/kg, par voie intra-péritonéale, provoque chez le rat femelle une oligurie. Il s'agit vraisemblablement d'une oligurie de type anaphylactoïde (TABORSKY, EFENDIC et IVANCEVIC, 1963) ; elle est freinée par les anti histaminiques qui n'ont pas d'action sur la sérotonine. L'hygroton (chlorthalidone) est sans action sur l'oligurie.

GIROMINI, JUNGER et DUCROT (1967) rapportent l'apparition d'une insuffisance rénale aiguë à la suite d'une perfusion de Dextran de faible poids moléculaire (Dextran 40) chez un malade hospitalisé pour une thrombose aiguë de la fourche aortique.

Les lésions histologiques provoquées par le Dextran de faible poids moléculaire répondent à l'aspect de néphrose osmotique ; elles sont caractérisées par un gonflement massif des cellules tubulaires proximales. Ces altérations ne sont pas spécifiques du Dextran 40 et on les a observées après l'administration de solutés d'hydrate de carbone, mais aussi d'E.D.T.A. Les travaux expérimentaux montrent que la perfusion de ces solutés entraîne constamment l'apparition de lésions rénales de néphrose osmotique, mais qui sont totalement réversibles dans un délai de trois à quatre jours. Ces lésions n'entraînent pas d'insuffisance rénale dans l'immense majorité des cas. Certains auteurs (JOHNSTON, BICKERAY) ont découvert des lésions de néphrose osmotique à l'autopsie de sujets ayant reçu du Dextran, alors qu'aucun signe clinique ou biologique d'insuffisance rénale n'avait été noté. Les modifications fonctionnelles provoquées par l'administration de Dextran de faible poids moléculaire sur le rein normal ont été étudiées. On observe une augmentation de l'excrétion de l'eau libre. Pour GELIN et INGELMAN, le facteur essentiel est l'augmentation du flux plasmatique rénal, bien qu'on ne puisse éliminer la participation d'une diurèse osmotique due à la présence à l'intérieur des lumières tubulaires de fortes concentrations de Dextran 40. L'administration de vasopressine inhibe totalement l'effet du Dextran ; aussi, l'augmentation de la diurèse serait-elle peut être en rapport avec une diminution de l'hormone anti-diurétique.

On peut se demander dans ces conditions quel est le mécanisme de l'insuffisance rénale secondaire à l'administration du Dextran. Un facteur important peut être constitué par la précipitation de Dextran à l'intérieur des lumières tubulaires. Il est également vraisemblable que des dépôts intra-cellulaires puissent exercer une action nocive sur le fonctionnement cellulaire (MORGAN, LITTLE et EVANS, 1966). Cette dernière hypothèse est celle qui s'accorde le mieux avec nos résultats expérimentaux. Ces auteurs ont trouvé en effet que les biopsies montraient

des cellules bourrées d'une substance P.A.S. positive, qu'ils supposent être du Dextran. D'autres observations ont été publiées récemment (FILLASTRE et Coll., 1967 ; AUQUIER et Coll., 1968). Les images des biopsies présentées sont extrêmement comparables aux images dites de clarification que nous avons décrites chez le Rat. AUQUIER et Coll., les décrivent ainsi : les cellules épithéliales de tous les tubes proximaux sont le siège d'une turgescence monstrueuse. Les lumières tubulaires sont soit réduites à un fin pertuis, soit devenues virtuelles. Les segments tubulaires plus distaux sont peu atteints : l'épithélium contient quelques vacuoles, la lumière des tubes reste large et non envahie par des cylindres. Les glomérules sont d'apparence normale ; le flocculus paraît rétracté dans la capsule glomérulaire, les anses capillaires sont fines et normales. L'interstitium ne contient aucun infiltrat cellulaire et les vaisseaux sont normaux. GOLDENBERG, VULCRANE et POBBER (1947) ont trouvé que les lysosomes rénaux diminuaient en nombre après administration du Dextran, tandis que les vacuoles intra-cellulaires apparaissaient en nombre important (in : AUQUIER, 1968). L'atteinte des lysosomes est d'autant plus probable que l'activité phosphatasique acide de ces cellules devient nulle après administration de Dextran.

c) Tween :

La leucocytose au Tween, très significative dans nos expériences, est peut être liée à l'action histaminogène du Tween (WIEGERSHAUSEN et KUPKE, 1959). On sait, en effet, qu'injecté au Chien, le Tween détermine des troubles analogues à ceux de l'injection d'histamine. Or, chez le Lapin, PIETTE et PIETTE (1959), ont obtenu une leucocytose par des libérateurs d'histamine comme le sulfate de protamine et le composé 48/80. En libérant de l'histamine, le Tween agirait peut-être de la même manière.

CALCAGNO (1962), se basant sur une étude bibliographique concernant les polysorbates (groupe dont fait partir le Tween 80) recommande de n'employer ces tensio-actifs qu'avec discernement.

CHARNICKI (1958) rappelle que dans la série des agents tensio-actifs non ioniques, des membres de la série des polysorbates, des Tweens et des pluronics sont utilisés dans des préparations parentérales. D'après cet auteur, l'ordre de toxicité du Tween 80 est supérieur à 25 g pour la DL 50 per os chez le Rat et de 5,8 g par kg pour la DL 50 par voie intra-veineuse chez le Rat. L'auteur énumère ensuite les accidents ou incidents provoqués par l'emploi de certains tweens comme solvant de solutés injectables. L'administration per os de Tween 80 ne provoque pas chez l'Homme d'augmentation de l'oxalurie ; certains malades ayant reçu du Tween 80 ont présenté une albuminurie passagère .

d) Méthylcellulose :

ROWLEY et Coll. (1962), en injectant à des rats de la méthylcellulose, déterminent de manière constante de l'anémie, de la splénomégalie et des lésions rénales. Ces dernières sont identiques, que la rate ait été ou non enlevée, ce qui élimine le rôle de cet organe dans le déterminisme des lésions rénales. La durée de vie des érythrocytes étant normale, l'auteur suppose qu'un des facteurs au moins de l'anémie réside dans la lésion rénale.

HALL et HALL (1961, 1962) constatent une hypertension artérielle chez le Rat qui a reçu des injections de méthyl-cellulose ou de polymères de l'alcool-polyvinyle. L'hypertension paraît secondaire à des lésions rénales diffuses qui portent sur les glomérules, sur les vaisseaux (hémorragies), sur les tubules et sur le tissu interstitiel.

e) Autres polymères :

En intoxiquant des lapins avec des surfactifs du groupe des alkylphénols polyoxyéthylés à la dose de 1 g/kg, (soit environ 50 p. 100 de la dose tolérée par la Souris), JOLY (1961) a observé une anurie pendant les 24 premières heures,

en même temps qu'une augmentation passagère du taux de l'urée sanguine au même temps. Une légère glomérulo-néphrite épithéliale était constatée par cet auteur au moment du sacrifice, soit 8 jours après l'ingestion des surfactifs. Notons que ces produits possèdent une forte action hémolytique in vitro (à des concentrations de 1 p. 1000 pour les non ioniques, de 0,1 p. 1000 pour les dérivés sulfatés).

Le RD 025, copolymère de l'oxyde d'éthylène et du propylène-glycol a été étudié par HUNTER et Coll. (1967). A fortes doses, il provoque chez le Rat des lésions tubulaires avec hématurie et légère oxalurie.

G) Les lésions de néphrose osmotique : Infrastructure et participation des organelles.

MAUNSBACH, MADDEN et LATTA (1962) ont étudié les modifications des tubules proximaux du rein chez le Rat, par microscopie optique et électronique, après administration de glucose, de mannitol) de saccharose ou de Dextran. Ces auteurs ont utilisé des rats mâles de race Sprague-Dawley, pesant de 130 à 200 g.

La perfusion veineuse d'une solution de glucose à 20 p. 100 (0,35 ml par minute et par 100 g) produit des changements caractéristiques dans les tubes proximaux : essentiellement augmentation du nombre et de la taille des vacuoles apicales trouvées dans le cytoplasme, surtout dans la première portion du tube proximal. Il y a aussi une accumulation assez forte de grands granules cytoplasmiques denses dans les portions moyennes des cellules, tout au moins au début.

La perfusion veineuse de mannitol (solution à 20 p. 100, pendant une ou deux heures) produit des changements plus prononcés que la perfusion de glucose. Une demi-heure après le début de la perfusion, la vacuolisation apicale est tout à fait évidente en microscopie photonique. La microscopie électronique révèle que la plupart des vacuoles apicales ne contiennent pas de matériel osmophile. Les corpuscules cytoplasmiques denses sont présents après une demi-heure et deux heures de perfusion, mais deviennent moins fréquents après deux heures. Lorsque le mannitol est injecté par voie sous-cutanée (solution à 5 p. 100) à des doses de 20, 35 et 50 ml pendant 3, 5 et 7 heures, les changements sont très semblables à ceux observés après la perfusion veineuse, mais plus prononcés au stade tardif. Après 7 heures, le cytoplasme des tubes proximaux est chargé de vacuoles, et les corps denses caractéristiques normalement présents sont absents ou très diminués.

Des injections sous-cutanées de saccharose produisent des lésions semblables à celles obtenues par le mannitol.

Le Dextran intra-veineux donne des changements cellulaires analogues mais moins prononcés, sans doute en partie en raison du faible temps écoulé entre l'injection de Dextran et la fixation dans ce travail (0,5 ml de dextran intra-veineux, fixation après 40 minutes).

Au point de vue physiologique et pharmacologique, il convient de noter que les modifications cellulaires qui suivent l'administration de mannitol, donnent aux cellules un aspect si anormal pendant la diurèse au mannitol que l'interprétation des expériences utilisant une diurèse provoquée par cette substance doit certainement être faite avec beaucoup de précautions, ce qui n'est pas toujours le cas chez les physiologistes.

Au début de la dernière décennie, un certain nombre d'auteurs ont suggéré une participation mitochondriale dans ces phénomènes (LANZ, 1955 ; MORARD, 1956 ; RANDERATH, 1959, in : MAUNSBACH et Coll., 1962). D'autres auteurs contestaient cette conception. Les vacuoles ont également été considérées comme des artefacts dus à une large imbibition par l'eau, ou comme dérivant des replis membranaires basaux.

Diverses expériences semblaient montrer des processus d'accumulation dans les mitochondries. Ainsi, POLICARD et Coll. (1960) ont observé l'accumulation de silice dans les mitochondries rénales de rats ayant reçu une injection intrapéritonéale de gel de silice. Lors de l'hémossidérose provoquée par injection intra-péritonéale d'hémoglobine, des granules ferrugineux ont été observés par RICHTER (1957) à l'intérieur de corpuscules cytoplasmiques limités par des membranes et contenant parfois des crêtes. Ces corpuscules, dénommés sidérosomes par l'auteur, pourraient dériver des mitochondries. De même, après injection de fer-dextran ou d'oxyde de fer-saccharose, on peut observer, dans les cellules du foie et de la rate, la présence de quelques sidérosomes et de mitochondries contenant des granules ferrugineux. DEMPSEY et WISLOCKI (1955) observent dans divers tissus de rats ayant absorbé du nitrate d'argent dans leur boisson, l'accumulation d'argent dans des corpuscules semblant dériver des mitochondries, ou dans des mitochondries dont les crêtes, bien que désorganisées, demeurent reconnaissables (in MAGNAN, 1961).

GABLER (1960) étudie l'ultrastructure de la rate du Rat à la suite d'injections intraveineuses ou intra péritonéales de Dextran 75.000 et de PVP 40.000. Une injection unique de 2 ml de Dextran à 6 p. 100 donne un léger gonflement des mitochondries de la rate, accompagné de dissolution et d'une légère et fine granulation des structures internes de la mitochondrie. Lors d'administration massive de substances, cet auteur note une augmentation de volume et la fusion de petites vacuoles situées à l'intérieur du corps de la mitochondrie, ce qui donne une transformation vacuolaire complète des mitochondries avec formation partielle de vacuoles géantes contenant un substrat granuleux, séparé du reste du cytoplasme par une mince frange osmophile. Une nette réduction numérique des mitochondries normales est observée en même temps que la formation des vacuoles. Le réticulum endoplasmique est repoussé et comprimé sous l'action des vacuoles d'accumulation.

ROULET (1962, communication personnelle), après examen de nos coupes, interprétait la clarification de l'épithélium des tubes contournés, après administration de PF-68 dans nos conditions expérimentales, comme une lésion due à l'adsorption des molécules introduites sur les mitochondries. Ces lésions ressemblent d'après cet auteur aux lésions observées chez l'Homme après infusion de glucose ou de PVP. Il signalait que la phagocytose de ces corps semble varier beaucoup puisque nous n'avons trouvé la clarification (correspondant sans doute à une résorption du Pluronic filtré par le glomérule) que dans le rein et non dans les cellules du système réticulo-histiocytaire (comme on le voit après introduction de PVP). Pour lui, l'intoxication par l'éthylène-glycol favoriserait la résorption du Pluronic au niveau des tubes contournés, c'est-à-dire au niveau d'un épithélium lésé dans ses fonctions par l'intoxication au glycol.

En fait, actuellement, un grand nombre d'arguments expérimentaux semblent donner une part prépondérante aux lysosomes ou à leurs dérivés dans tout ce qui concerne ces processus d'absorption (HOUDRY, 1968). La conception actuelle d'un système de transport mettant en jeu les vésicules de pinocytose, les grandes vacuoles et les lysosomes primaires correspond parfaitement aux quelques éléments expérimentaux que nous allons rapporter maintenant.

TRUMP et JANIGAN (1962) ont étudié la vacuolisation cytologique dans la néphrose au saccharose (rats Sprague-Dawley : 120 à 300 g ; une injection intra-péritonéale de 2 à 6 ml d'une solution aqueuse de saccharose à 50 p. 100. Pour ces auteurs, la formation de vacuoles dans le tubule proximal provient de l'agrandissement progressif de corpuscules à membrane simple contenant de la phosphatase acide, et qu'ils pensent être des lysosomes (Le terme lysosome se rapporte pour ces auteurs à des corps limités par une seule membrane, de 0,5

à 1 micron, qui contiennent au moins 10 hydrolases acides. La définition du lysosome étant strictement biochimique, il est toujours difficile de faire correspondre des images cytologiques avec ce terme). Après administration de saccharose, les corpuscules cytoplasmiques de l'épithélium tubulaire proximal grossissent progressivement, souvent avec rupture et confluence. On comprend que ces changements permettent la libération de phosphatase acide dans le cytoplasme, ainsi que les autres hydrolases. En effet, au stade avancé des lésions, une activité phosphatasique acide diffuse a été souvent notée dans le cytoplasme et dans le noyau par TRUMP et JANIGAN. Bien que la technique de ces auteurs soit parfois critiquable, il est vraisemblable que ces résultats sont corrects. De plus, ils ont observé une augmentation des quantités de phosphatases acides éliminées dans l'urine. Ces auteurs ne trouvent aucune preuve d'un gonflement des mitochondries, du réticulum endoplasmique, ou des espaces extra-cellulaires au niveau des replis de la membrane basale.

Les observations de MAUNSBACH et Coll., 1962, après glucose, mannitol, saccharose ou Dextran, montrent que les changements cytologiques commencent du côté luminal de la cellule du tubule et suggèrent que ces changements sont déclenchés par l'apparition dans le fluide tubulaire de la substance injectée. Ces auteurs n'ont pas déterminé si les vacuoles contenaient les substances injectées. Cependant, les protéines filtrent à travers les glomérules et sont trouvées dans les vacuoles ou dans les granules des cellules tubulaires proximales ; ces protéines sont probablement résorbées à partir de la lumière tubulaire par un processus de pinocytose. Il semble probable que l'accumulation de vacuoles après l'administration de glucose, de mannitol, de saccharose ou de Dextran indique une modification dans l'activité pinocytyque normale des tubes proximaux, due à la présence de la substance injectée dans le liquide de la lumière tubulaire absorbée par la cellule. Les hydrates de carbone, normalement, n'induisent pas la pinocytose. Cependant, ces substances peuvent être absorbées en même temps que d'autres, lorsque la pinocytose est induite par des protéines, des amino-acides ou certains sels qui provoquent la pinocytose dans des cellules diverses. L'accumulation des grandes vacuoles peut exprimer un trouble de la disparition normale des vacuoles pinocytiques. Cette disparition pourrait être particulièrement difficile quand les vacuoles contiennent des substances qui ne sont pas normalement métabolisées par les cellules tubulaires. Il apparaît très vraisemblable que des phénomènes du même ordre soient mis en jeu dans la résorption de nos polymères au niveau du tubule, et dans leur maintien dans la cellule par suite d'un métabolisme inefficace.

Les corps cytoplasmiques denses se trouvent normalement en grand nombre dans les cellules tubulaires. Certains d'entre eux contiennent certainement de la phosphatase acide et d'autres enzymes hydrolytiques. La diminution de leur nombre durant les stades tardifs des perfusions de mannitol, montre que ces corpuscules sont mis en jeu dans les modifications cellulaires. La présence de matériel dense, amorphe ou membraneux dans certaines vacuoles localisées près de la basale suggère à MAUNSBACH, MADDEN et LATTA (1962), une connection entre ces vacuoles et les corps cytoplasmiques denses, peut-être par l'intermédiaire d'une fusion des deux types de corpuscules ou d'une transformation des corps cytoplasmiques denses en vacuoles. Ces faits sont tout à fait analogues à ceux que nous observons lors de la résorption des polymères, puisque nous observons d'une part le gonflement des corps cytoplasmiques denses, d'autre part, à certains stades, la présence de vacuoles envahissant toute la cellule, avec parfois des résidus de matériel dense à l'intérieur, et à ce moment une disparition des corps cytoplasmiques denses normaux. JANIGAN et SANTAMARIA (1961) ont également observé par histochimie des corpuscules contenant de la phosphatase acide, de taille augmentée, pendant la néphrose osmotique au saccharose. TRUMP (1961) arrivait à des

conclusions comparables dans l'étude de la résorption tubulaire du bleu Trypan et du dioxyde de thorium.

FISHER (1964) a étudié les gouttelettes hyalines, que l'on trouve dans les épithéliums tubulaire et glomérulaire au cours de la protéinurie. On trouve un grand nombre de ces gouttelettes hyalines chez le Rat, qui est physiologiquement protéinurique, alors que dans d'autres espèces où la protéinurie est normalement minime ou absente, on ne les trouve pas (Cobaye adulte, Lapin, Chien, Chat, Homme; DAVIES, 1954). STRAUS (1954) a séparé distinctement les gouttelettes hyalines des mitochondries et a observé que ces organelles incorporent la peroxydase du raifort (STRAUS, 1957). En même temps, la présence de diverses enzymes, dont la phosphatase acide, a été démontrée dans ces particules. NOVIKOFF (1961) a montré que les gouttelettes P.A.S. positives qui apparaissent à la suite de l'injection de blanc d'oeuf, possèdent également une activité phosphatasique acide. FISHER (1964) a rendu néphrotiques des rats Wistar femelles de 150 à 175g, en les traitant par de l'amino-nucléoside (1) ou du sérum anti-rein. Il a montré par cette technique que certaines gouttelettes hyalines de l'épithélium tubulaire et glomérulaire contenaient de la phosphatase acide, tandis que d'autres ne montrent pas cette activité phosphatasique. Ceci pourrait indiquer une hétérogénéité des activités enzymatiques du lysosome. D'après certaines de ses observations, FISHER pensait que les lysosomes pouvaient éventuellement dériver des mitochondries. Dans la théorie de NOVIKOFF (1961), plus généralement admise, les gouttelettes proviennent de vacuoles pinocytiques dans la bordure en brosse de l'épithélium tubulaire qui confluent ultérieurement pour donner une particule plus grande ; celle-ci se déplace vers la zone basale de la cellule, dans la région de l'appareil de Golgi, où elle se charge d'une activité phosphatasique acide, par confluence avec des corpuscules contenant cette enzyme. HOLLANDE (1969) fait des observations comparables dans les cellules d'invertébrés.

Au cours de l'absorption d'albumine homologue marquée à l'iode 125, MAUNSBACH (1966 d) étudie l'ultrastructure des cellules tubulaires proximales, grâce à une technique élégante, utilisant des injections à la micropipette dans le tubule. Les tubules injectés sont ensuite fixés par microperfusion de glutaraldéhyde, et le tissu est analysé par autoradiographie en microscopie électronique.

Six à dix minutes après le début de la perfusion d'albumine marquée à l'iode 125, la plus grande partie de la protéine absorbée est localisée dans les grandes vacuoles apicales des cellules tubulaires proximales, mais une petite quantité de marqueur se trouve également dans les petites vacuoles apicales. Ces observations suggèrent que l'albumine marquée est transférée dans les grandes vacuoles par l'intermédiaire des petites vacuoles apicales ; celles-ci représentent vraisemblablement de petites invaginations de la membrane apicale de la cellule qui se sont refermées pour former des vésicules. Après trente minutes, la plus grande partie du marqueur est présente dans des corps cytoplasmiques limités par une triple membrane d'environ 90 Å d'épaisseur, possédant un contenu dense aux électrons, localisés dans la région moyenne ou apicale des cellules (type 2). Après 60 minutes, le marqueur se trouve dans les mêmes corps cytoplasmiques, répartis dans toute la cellule.

En combinant l'autoradiographie au microscope électronique avec l'histochimie, on observe que les corps cytoplasmiques marqués donnent une réaction positive pour la phosphatase acide. Cette dernière observation indique que les corps cytoplasmiques dans lesquels l'albumine marquée à l'iode 125 est localisée, sont des lysosomes. L'auteur suggère qu'au moins une partie de l'albumine absorbée est

(1) 6-diméthylamino-purine-3-amino-d-ribose.

dégradée dans ces lysosomes.

La même technique, appliquée à la ferritine, indique que celle-ci est transportée par un processus semblable des vésicules de pinocytose aux grandes vacuoles (MAUNSBACH, 1966 e).

DINGEL et BARRETT ont discuté la possibilité pour les lysosomes de concentrer certains colorants cationiques et certaines drogues (in BERNHARDT, 1968). L'orangé d'acridine injecté au Rat est pris en charge par les lysosomes du rein. In vitro, les lysosomes du rein isolés sont rapidement colorés par l'orangé d'acridine, qui leur donne une fluorescence orange, tandis que les mitochondries apparaissent en vert. Des mesures de la concentration du colorant par DINGEL et BARRETT pendant ces expériences in vivo et in vitro montrent que les lysosomes, si on se rapporte au volume de la particule, absorbent beaucoup plus de colorant que les mitochondries. De même, 24 heures après injection de diméthylbenzanthrène marqué au carbone 14, une radioactivité notable est présente dans la fraction mitochondriale, dans la fraction microsomale et dans la fraction lysosomale d'un homogénat de rein. Mais 5 jours plus tard, l'activité spécifique se trouve toujours dans les lysosomes, tandis que celle du reste des particules a considérablement diminué. Des expériences poursuivies par électrophorèse sur gel d'extraits obtenus à partir des fractions lysosomes de broyats de reins de Rat, ont montré que les lysosomes du rein de Rat contiennent un constituant fortement acide, qui semble lipidique, et qui contient des groupements aldéhydes libres ou faiblement combinés ; cette substance est peut-être mise en jeu dans la liaison des molécules cationiques et lipophiles à l'intérieur des organites.

D'autres détails se trouvent dans STRAUS (1967), DE DUVE et WATTIAUX (1966), HOURDRY (1968).

H) Les lésions rénales sont-elles une thésaurosmose ?

On peut se demander d'une part si les rétentions de polymères peuvent être considérées comme une pharmacothésaurismose, d'autre part, essayer de rapprocher cette rétention du mécanisme des thésaurosmoses endogènes. On parle de thésaurosmose lorsqu'une matière chimique d'origine endogène se trouve anormalement accumulée dans les tissus. La glycogénose représente la plus ancienne de ces maladies. C'est pour elle que VON GIRKE (1929) a forgé le terme de "Thésaurismose" (in DI MATTEI, 1960). Mais en fait, le concept original de thésaurosmose ne s'applique pas uniquement à des substances endogènes et il peut vraisemblablement être étendu à la conception d'un dépôt chimique anormal associé à des altérations pathologiques du tissu qui en est le siège. Il s'en suit que la nature endogène de la matière déposée perd sa physionomie de facteur spécifique (DI MATTEI, 1960). Parmi les mécanismes de thésaurosmose, il existe d'une part la rétention anormale de produits amenés de l'extérieur en grande quantité, comme c'est le cas du fer dans les hémochromatoses. Dans d'autres cas il s'agit d'un manque de destruction d'une substance normale, par défaut d'un système enzymatique, comme c'est le cas dans la plupart des polycories (ce terme, dû à DEBRE, désigne des thésaurosmoses se localisant dans les tissus nobles).

Or, il est intéressant de constater que nous avons mis en évidence une atteinte précoce des lysosomes dans les cellules du tubule rénal, et que ces lysosomes paraissent être mis en jeu, au niveau d'autres organes, dans les rétentions pathologiques chez l'Homme. Une polycorie, comme la glycogénose de type II, correspond à l'absence congénitale d'une α glucosidase acide, normalement présente dans les lysosomes, avec accumulation de glycogène dans les vacuoles. Des modifications de cet ordre, dues à l'absence d'autres hydrolases acides, ont été nommées maladies lysosomiales congénitales (HERS, 1965 a).

Dans le gargoylisme et la maladie de Morquio, les images infrastructurales

observées dans les hépatocytes rappellent celles des hépatocytes du Rat après administration de Triton WR 1339 : les corps denses péri-biliaires, aspect normal des lysosomes, ont disparu, tandis que de larges vacuoles parsèment le cytoplasme (VAN HOOFF et HERS, 1967). On trouve au niveau de ces vacuoles de la phosphatase acide, et elles renferment très vraisemblablement les muco-polysaccharides qui s'accumulent dans cette affection. Dans la maladie de Fabry (thésaurismose à céramide-trihexosides), on a montré l'accumulation de lipides dans des vacuoles du foie et du rein, à la suite de la déficience d'une β -galactosidase, probablement lysosomiale. Dans la maladie de Tay-Sachs (polycorie à gangliosides), différents granules anormaux renfermant de la phosphatase acide ont été décrits au niveau du cerveau. Des arguments en faveur d'une participation lysosomiale ont été également rapportés dans la maladie de Niemann-Pick (dépôt de lécithines), la leucodystrophie métachromatique (dépôt de sulfatides), la maladie de Gaucher (accumulation de glucocérébrosides). On trouvera une bibliographie détaillée sur la question dans le travail de VAN HOOFF et GERS (1967). Dans la maladie de Gilbert, les cellules de Kupffer du foie contiennent de nombreux lysosomes contenant un matériel dense aux électrons, correspondant vraisemblablement à des pigments (ROUILLER et Coll., 1967).

Chez l'Homme, une pharmacothésaurismose à la PVP a été rapportée par DELBARRE, PAOLAGGI et BASSET (1964) chez deux malades ayant reçu chacun environ 2 kg de PVP au total. Les lésions constatées étaient d'une part un remaniement osseux important, d'autre part d'importants dépôts aux points d'injection dans les fessiers (L'administration I.M. avait été faite comme véhicule retard de l'hormone post-hypophysaire, pour traitement de diabète insipides). Différents autres tissus sont également surchargés.

D'autres observations de surcharge à la PVP ont été rapportées chez l'Homme : une quinzaine environ. Expérimentalement, divers auteurs ont obtenu des cellules spumeuses thésaurisantes après injection de Dextran ou PVP (in DELBARRE, 1964). CAULET et Coll. (1968) en ont rapporté récemment deux cas.

Notons pour terminer que chez l'Homme, un caractère essentiel de la pharmacothésaurismose est d'être une infection individuelle, constatée spécialement chez un individu particulier. Par contre, la reproduction expérimentale d'une pharmacothésaurismose est souvent possible chez un pourcentage appréciable d'animaux lorsque certains caractéristiques biologiques ou biochimiques dérivant d'une constitution génétique particulière sont présents. Le rôle du terrain est très important dans l'obtention de ces pharmacothésaurismoses ; une maladie de l'animal, des facteurs diététiques créant des conditions dysmétaboliques, ont une grande importance pathogénique dans la production des pharmacothésaurismoses. Une description détaillée de telles expériences se trouve dans l'article de DI MATTEI (1960).

i) Rôle de la charge des polymères

Des polymères polyanioniques ou polycationiques peuvent peut-être interférer avec les éliminations ioniques dans le néphron. En effet, le rein normal possède dans la médullaire une quantité importante de polyanions qui, pour MORARD et POIRIER (1968) auraient un rôle dans la diurèse normale. D'après ces auteurs, "la substance interstitielle de la médullaire rénale (rats Wistar mâles et femelles) est particulièrement riche en mucopolysaccharides acides dont la distribution quantitative et la densité de charges ont leur maximum à l'apex papillaire, et, à un degré moindre, à la jonction des médullaires interne et externe". On y trouve essentiellement des polyanions sulfatés (sulfates de chondroïtine A, B, C, et kérato-sulfates), et des M.P.A. non sulfatés, nettement moins abondants (acide hyaluronique et rares glycoprotéines sensibles à la neuraminidase). Les membranes basales tubulaires (définies histologiquement) renferment des M.P.A. fortement sulfatés et

résistant à l'hyaluronidase.

Les glycolemmes (cell coats) épithéliaux sont soit des sulfomucines (collecteurs et Henlé), soit des sialomucines non métachromatiques, sensibles à la neuraminidase, irrégulièrement et très faiblement P.A.S. + (tubes contournés distaux). Les cytoplasmes épithéliaux contiennent, dans les anses grêles de Henlé, un matériel polyanionique ; dans les collecteurs, des granulations de mucoïdes légèrement sulfatés.

Le glomérule, la bordure interne des tubes contournés distaux, contiennent des sialomucines (polyanions carboxylés, faiblement acides) ; les basales des néphrons corticaux renferment des mucoïdes sulfatés.

Pour l'ensemble des polyanions de la médullaire, la densité des charges négatives obéit à un gradient cortico-papillaire. D'une espèce à l'autre, cette densité paraît varier selon la capacité de concentration urinaire, comme s'il y avait un rapport déterminant entre la quantité de charges négatives libres des structures papillaires et la molarité cationique qui, dans la médulla vivante, accompagne la concentration de l'urine. MORARD et POIRIER émettent l'hypothèse que les polyanions de la médulla du rein ont une fonction propre dans les transferts hydro-électrolytiques qui conditionnent l'élaboration de l'urine.

Au cours de divers types de diurèse provoquée chez le Rat, l'étude histo-chimique des mucoïdes acides de la médullaire rénale montre que la déshydratation et la diurèse osmotique (mannitol- vasopressine ; urée- vasopressine) changent la structure des polyanions papillaires et augmentent la densité de leurs charges. La diurèse aqueuse affecte ces mêmes polyanions de modifications inverses : la densité des charges négatives de tous les polyanions diminue fortement. Dans la diurèse osmotique (a priori proche de nos conditions expérimentales) les glycolemmes des collecteurs et des anses de Henlé deviennent plus électronégatifs. Ces transformations pourraient modifier l'attraction électrostatique des polyanions et ainsi l'accumulation intra-rénale de cations osmotiquement actifs. Elles pourraient également répondre de la quantité de sites actifs disponibles pour un échange distal entre ions H^+ tissulaires et ions Na^+ urinaires (MORARD et ABADIE, 1968).

J) Fixation et ultrastructure des cellules tubulaires proximales

Les cellules du tube rénal proximal sont particulièrement sensibles aux différentes conditions de fixation. Les caractéristiques du fixateur lui-même et celles de la méthode de fixation contribuent à de sérieuses variations des images électroniques. La fixation du tissu rénal par immersion de petits morceaux excisés provoque des artefacts dus au rapide collapsus des tubules proximaux après interruption de l'arrivée du sang aux reins. La fixation in vivo obtenue en faisant tomber le fixateur sur la surface du rein peut seulement préserver la couche superficielle de l'organe. Il est donc préférable d'utiliser des méthodes par perfusion. Cependant, ces méthodes sont relativement délicates et il est difficile de les mettre en oeuvre lors d'une expérience complexe au cours de laquelle d'autres variables sont mesurées. Ainsi, nous n'avons pu l'utiliser lors des expériences dans lesquelles nous désirions connaître le poids des organes et la valeur de certains paramètres biochimiques sanguins. La fixation par perfusion implique que l'animal soit traité et préparé uniquement en vue de cette opération.

1.— Méthodes de fixation (MAUNSBACH, 1966 g et h).

Le dépôt de fixateur sur la surface du rein donne une bonne fixation sur une épaisseur de 100 à 200 μ (meilleure avec OsO_4 que pour le glutaraldéhyde).

— Dans le cas de la perfusion vasculaire de glutaraldéhyde, ou bien la perfusion est entièrement remplie de succès avec une distribution rapide et complète de glutaraldéhyde dans le tissu rénal, ou bien les reins restent mal perfusés, les stades intermédiaires étant peu fréquents. Un rein bien perfusé a microscopique

ment une légère couleur jaune et une consistance dure qui permet de le couper en tranches minces ; sa couleur est uniforme et tous les tubules sont ouverts.

La perfusion est plus difficile avec le tétr oxyde d'osmium qu'avec le glutaraldéhyde.

— Enfin, une bonne technique de fixation est la microperfusion de tubules isolés, par la lumière du tubule, au moyen d'une micropipette.

2.— Critères d'une bonne fixation :

a) lumière tubulaire.

Des observations en microscopie optique de la surface du rein chez l'animal vivant et après congélation rapide ont montré que les tubes proximaux dans les reins en fonctionnement ont des lumières ouvertes. L'interruption du flux sanguin rénal avant la congélation montre que les lumières des tubes proximaux disparaissent en dix ou vingt secondes chez la Souris. La présence de lumières ouvertes est donc un signe de bonne préservation.

b) bordure en brosse et région cellulaire apicale.

La bordure en brosse dans un tissu bien préservé doit avoir une apparence régulière, et toutes protrusions de cellules dans la lumière, sauf si elles sont très petites, représentent des artefacts de préparation. La présence de noyaux et de diverses autres structures dans la lumière des tubules proximaux est probablement un artefact. Il faut cependant se rappeler que des hématies et des leucocytes peuvent s'y trouver, puisqu'on en trouve normalement quelques-uns dans l'urine.

c) espaces extra-cellulaires.

Le facteur le plus important semble être l'osmolarité des fixateurs. De grands espaces extra-cellulaires sont présents lorsque l'on fixe avec des solutions hypertoniques. A l'heure actuelle, il n'est pas possible de dire avec certitude quel est l'espacement normal entre les membranes cellulaires adjacentes. La largeur sensiblement constante de l'espace clair entre des membranes adjacentes après une fixation au tétr oxyde d'osmium indique sans doute qu'un espace similaire existe aussi in vivo. Cet espace peut contenir un matériel de liaison intercellulaire qui réagit faiblement avec l'osmium.

L'absence complète d'un tel espace en beaucoup d'endroits après fixation au formol et post-osmification pourrait signifier que ce matériel de liaison est dissous par la fixation aldéhydique.

d) orientation des mitochondries.

Il est vraisemblable que lorsque les mitochondries sont arrangées perpendiculairement à la basale, la fixation est meilleure que lorsque les mitochondries se trouvent obliques.

e) ultrastructure des mitochondries

Les élargissements irréguliers des mitochondries formant des zones claires de gonflement, observés surtout après fixation au glutaraldéhyde, semblent être des artefacts. MAUNSBACH (1966 g) ne les a jamais trouvés après une fixation initiale au tétr oxyde d'osmium.

f) figures myéliniques

Il semble bien qu'il s'agisse d'un artefact, car on ne les trouve pas après une fixation initiale au tétr oxyde d'osmium.

g) altérations tissulaires dans les fragments fixés par immersion.

Des tubules proximaux fixés par immersion de morceaux excisés du rein montrent des lumières tubulaires fermées avec une bordure en brosse dense et tassée, un gonflement du cytoplasme et des protrusions irrégulières dans la lumière tubulaire. Ceci indique une mauvaise préservation du tissu. Aussi faut-il se garder d'évaluer la forme générale et la taille des cellules, l'arrangement de la bordure en brosse, la distance entre divers composants cellulaires ou la largeur des espaces

extra-cellulaires entre les membranes de cellules adjacentes. Par contre, il semble que l'ultra-structure des corpuscules cytoplasmiques soit peu affectée par les altérations cellulaires qui se produisent immédiatement après l'interruption du flux sanguin, et que ces corpuscules puissent être bien analysés sur des tissus fixés par immersion.

3.— Influence de la composition des fixateurs.

a) osmolarité et force ionique.

Des différences ont été observées entre des cellules tubulaires proximales fixées au glutaraldéhyde, lorsque les solutions diffèrent seulement par la quantité de chlorure de sodium qu'elles contiennent. C'est l'osmolarité qui semble intervenir. Il semble qu'un changement de 25 p. 100 du contenu total en chlorure de sodium dans le fixateur (correspondant à 55-60 mOsm) soit clairement reflété dans les changements de la structure fine de la cellule (MAUNSBACH, 1966 h).

Lorsque la quantité de chlorure de sodium est la moitié de la normale, les cellules tubulaires proximales apparaissent gonflées et agrandies. Les parties apicales font protrusion dans la lumière. Le cytoplasme a une faible densité. Même sans post-fixation à l'osmium, les membranes cellulaires apparaissent à trois couches. Les mitochondries sont gonflées, les noyaux arrondis. La membrane limitant les corps cytoplasmiques de type 2 apparaît quelquefois rompue. Au contraire, lorsque la fixation est faite avec un glutaraldéhyde contenant une double dose de sodium, les cellules tubulaires proximales apparaissent très rétrécies. Les membranes latérales basales sont largement séparées dans tous les tubules. Les noyaux sont crénelés, denses aux électrons, de forme irrégulière. La plupart des corps cytoplasmiques de type 2 (habituellement arrondis en section transversale) apparaissent irréguliers.

b) rôle des tampons.

Contrairement à l'osmolarité, le choix du système tampon semble être d'importance mineure lors de la fixation par perfusion de glutaraldéhyde.

La comparaison de tampons phosphate, véronal, Tyrode sans phosphate, n'a pas montré de différences à MAUNSBACH (1966 h).

K) Le problème des inclusions cristallines intra-corpusculaires.

Des corpuscules cytoplasmiques cristallins, ou des inclusions cristallines dans des corpuscules cytoplasmiques ont été souvent observés en microscopie optique dans les tubules proximaux du rein humain dans des conditions pathologiques telles que le myélome multiple.

Chez des rats normaux ayant reçu des injections de peroxydase du raifort, STRAUS (1967) a vu en microscopie photonique des zones cristallines dans des granules du tube proximal, contenant de la peroxydase et colorés par la benzidine. Il s'agit là visiblement de phénomènes de résorption.

En microscopie électronique, les observations de corps ou d'inclusions cristallines sont plus rares. RICHTER (1957) a observé des aspects cristallins dans des granules d'hémossidéridine formés dans les cellules tubulaires proximales du rein de Rat après injection d'hémoglobine et a montré que ces aspects étaient semblables à ceux qui sont présents dans des sections de ferritine cristallisée. HIMMELOCH, KARNOVSKY (1961) ont observé des inclusions de forme cristalline dans des corpuscules cytoplasmiques de tubules proximaux de Necturus.

La présence d'inclusions cristallines dans des corpuscules cytoplasmiques de cellules tubulaires proximales du rat normal a été mentionnée par ERICSSON (1964), puis MAUNSBACH (1966 f) a rapporté dans une étude très détaillée leur morphologie.

Une fois encore, les descriptions de cet auteur sont les plus proches des aspects que nous avons nous-mêmes observés. Les aspects cristallins sont rencontrés

dans des corpuscules de type 2, dans le second segment du tube proximal. Aux grossissements inférieurs à 15.000 X, le matériel dense de ces corpuscules apparaît relativement homogène. Aux forts grossissements toutefois, une partie ou l'ensemble du matériel dense de certains corps montre des aspects très réguliers ressemblant à des structures cristallines en réseau.

Bien que leur fréquence varie d'un animal à l'autre, des aspects cristallins ont été trouvés chez tous les rats d'une série de 40 adultes de race Sprague-Dawley. Par contre, bien qu'une étude approfondie n'ait pas été faite, MAUNSBACH (1966f) n'a pas trouvé de matériel cristallin dans les corpuscules cytoplasmiques du tubule proximal de rats femelles adultes ou de rats mâles âgés de moins d'un mois.

Les figures cristallines ont plusieurs aspects, mais celles qui se rapprochent le plus des nôtres sont de grands corpuscules denses et irréguliers, presque entièrement occupés par des réseaux cristallins. Ces corps peuvent être très grands et MAUNSBACH a observé dans une seule section une inclusion de 19 μ de long. Ils ont sans doute une configuration spatiale très complexe et plusieurs corps cytoplasmiques semblant séparés sur une seule photo pourraient en fait représenter des parties du même corpuscule. Ces corps n'ont jamais été vus en continuité directe avec les mitochondries, avec quelque type de cytomembrane que ce soit ou avec un autre organe cellulaire. Les zones de Golgi sont souvent proches des corps à aspects cristallins. Les forts grossissements (400.000 x à 1.000.000 x sur les tirages) montrent divers types de réseaux cristallins. Notre technique personnelle n'était pas assez fine pour atteindre de tels grandissements, mais nous avons cependant pu obtenir des aspects de trames sur certains de nos clichés agrandis à 300.000 x.

MAUNSBACH fait remarquer que les réseaux ne sont pas vus sur des coupes non colorées. On les observe après fixation au glutaraldéhyde, au formol ou au tétroxyde d'osmium, pourvu que le contraste soit fait au moins à l'acétate d'uranyle. Toutefois, on les voit mieux après double contraste uranyle et plomb. Ces résultats sont conformes avec nos examens à la microsonde de Castaing, qui indiquent l'absence d'éléments minéraux denses dans les inclusions cristallines, en dehors de ceux apportés par l'agent de contraste.

Les corpuscules cytoplasmiques contenant du matériel cristallin montrent une activité phosphatase acide et ont une membrane limitante distincte ; ces caractères les apparentent aux lysosomes. L'absence de produits de réaction sur le matériel cristallin lui-même après incubation dans le milieu de GOMORI semble indiquer que ces inclusions cristallines ne contiennent pas de phosphatase acide. Toutefois, il ne faut pas exclure la possibilité que la phosphatase soit en fait présente à cet endroit, mais non active, en raison de l'organisation cristalline.

Quelques-unes des images observées par MAUNSBACH sont très semblables aux images publiées pour des préparations de protéines cristallisées *in vitro* telle que ferritine, protéines purifiées du muscle, uricase. Elles sont aussi comparables à des images de surface de protéines cristallines obtenues par ombrage, par exemple catalase ou β -lactoglobuline. Certains aspects sont aussi partiellement semblables aux réseaux observés dans les plaquettes des granules vitellins (HONJIN et NAKAMURA, 1967), bien que la plupart des espacements observés par MAUNSBACH soient plus petits. L'histochemie et l'analyse des plaquettes isolées indiquent que ces plaquettes contiennent des protéines et des lipoprotéines.

Dans le tissu rénal, d'autres aspects cristallins ont été observés par MILLER (1961) et par RHODIN (1962) dans des corpuscules cytoplasmiques de cellules des tubules collecteurs corticaux. Les aspects observés par MILLER consistent essentiellement de points ou de bandes incurvées avec des distances de centre à centre d'environ 96 Å. Cet auteur présente des données histochimiques indiquant que ces corps cytoplasmiques contiennent des lipo-protéines. Dans des granules de cellules de l'appareil juxta-glomérulaire, BARAJAS et LATTA (1965) ont observé

récemment des aspects cristallins semblables à ceux décrits par MAUNSBACH.

En conclusion, ces observations fournissent peu d'information sur l'origine du matériel cristallin. Il semble probable que ce matériel est synthétisé dans la cellule. Toutefois, on ne peut pas exclure l'hypothèse selon laquelle le matériel cristallin représenterait une substance absorbée par les cellules tubulaires et concentré dans les lysosomes.

D'autres inclusions ont été décrites dans les lysosomes : ainsi ROWLATT (1958) trouve des lamelles et des tubules dans la glande coagulante de la Souris adulte. Citons encore l'épithélium du côlon de la Souris (SILVA, 1967), les nucléoïdes des microbodies du foie (SHNITKA, 1966), auxquels l'urate-oxydate est associée, mais ne semble pas constituer la structure cristalline (BAUDHUIN, BEAUFAY et DE DUVE, 1965), les granules des leucocytes éosinophiles, etc...

CHAPITRE VIII

DISCUSSION GENERALE

Nous avons décrit dans les chapitres précédents un certain nombre de faits. Nous allons tenter d'en faire une synthèse afin d'en tirer les arguments directs ou indirects confirmant ou infirmant notre hypothèse de travail, base commune d'interprétation des effets divers constatés : à savoir la participation d'une fixation de l'eau par solvation des polymères.

Nous résumerons tout d'abord les conclusions principales qui peuvent être tirées des expériences précédemment rapportées, et nous réunirons dans un tableau général les actions présentes ou absentes de chaque polymère. Puis nous évoquerons quelques travaux récents sur la structure de l'eau et son intervention dans les tissus vivants. Enfin, nous esquisserons des conclusions d'ensemble qui aboutiront à définir un certain nombre de voies de recherche à explorer dans l'avenir pour préciser ce travail ; celui-ci ne peut être qu'une ébauche, étant donné la variété des problèmes abordés.

I.- ETABLISSEMENT D'UN TABLEAU GENERAL DES EFFETS.

En ce qui concerne tout d'abord l'interaction avec les ions, on peut admettre que la formation de gels in vitro en présence de certains sels est spécifique du PF-68. Par contre, la formation de système biphasiques en présence de certains sels, oxygénés en particulier, a été constatée pour tous les polymères. Nous l'interpréterons comme un phénomène de relargage.

L'activité de l'ion sodium in vitro semble modifiée de façon analogue par les trois polymères, dans le sens d'une augmentation. Nous admettrons, par prudence, que nos mesures dans ce domaine sont d'une précision assez faible et nous ne retiendrons que l'aspect qualificatif de la question : augmentation d'activité, sans approfondir ses aspects quantitatifs. Cette augmentation de la concentration apparente du sodium peut être interprétée comme l'apparition d'une fraction d'eau liée aux polymères, se comportant comme non solvante vis-à-vis du sodium, d'où une augmentation de la concentration de cet ion dans l'eau restante. Cette interprétation s'accorde bien avec les discordances rencontrées entre la mesure des abaissements cryoscopiques et les poids moléculaires mesurés par d'autres méthodes. COUPER et ELEY (1948) avaient également observé un coefficient osmotique très élevé pour les PEG.

La précipitation des protéines est forte avec PF-68, légère avec PEG 6000, nulle avec PVP 11000.

Hématies : Au niveau des hématies, aucun des polymères ne montre d'effet hémolytique propre. Une protection contre l'hémolyse en solutions hypotoniques de CINa apparaît avec PF-68 et PEG 6000 et n'est pas observée pour PVP 11000. L'effet protecteur semble comporter une composante membranaire directe dans le cas de PF-68, et à un moindre degré de PEG 6000, comme le montrent les mesures de volume.

TABLEAU LXXII

RECAPITULATION DES PHENOMENES OBSERVES AVEC LES TROIS POLYMERES

Phénomènes étudiés	Polymères		
	PEG 6.000	PF-60	PVP 11.000
Formation de gels in vitro	0	+	0
Relargage des sels minéraux	+	+	+
Augmentation de l'activité du sodium	+	+	+
Discordance entre mesures cryométriques et autres mesures du PM	+	+	+
Augmentation du coefficient osmotique avec la concentration	+	+	±
Groupements lipophiles	0	+	0
Précipitation des protéines	±	+	0
Action hémolytique	0	0	0
Protection contre l'hémolyse osmotique	+	+	0
Action membranaire directe	±	+	0
Suppression de la motricité spontanée du muscle lisse intestinal	+	+	+
Altérations du muscle lisse intestinal.	±	+	0
Inhibition des spasmes à l'acétylcholine	±	++	+
Inhibition des spasmes au baryum	+	++	+
Suppression de l'influx dans le nerf isolé.	+	+	0
Diminution d'excitabilité et ralentissement de la conduction	+	+	+
Phase d'hypocholérèse	+	+	0
Proportionnalité dose/effet cholérétique.	0	0	+
Toxicité sur le rein malade	+	++	0

Nous rapprocherons à propos des hématies, deux faits forts différents, sans les interpréter : d'une part, les hématies possèdent des propriétés osmotiques bien différentes selon les sels minéraux constituant leur environnement ionique. PHILIPPOT (1962) a montré avec les hématies du Cheval que l'isotonicité est confondue avec l'iso-osmoticité seulement pour les sels suivants : ClNa , ClK , ClLi , BrNa , BrK , BrLi . Les solutions de bicarbonates, et surtout de sulfates, sont moins hypotoniques que ne le laisse prévoir leur osmoticité ; c'est l'inverse pour les solutions de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$. Nous avons retrouvé des résultats semblables sur des hématies humaines. D'autre part, nous avons constaté que les sulfates alcalins étaient particulièrement capables de provoquer des mélanges à deux phases avec tous les polymères, tandis que les chlorures ne donnaient pas ce phénomène, mais au contraire des gels monophasiques avec PF-68, et une solution normale avec PEG et PVP.

Aucun des polymères n'est hémolytique par lui-même in vivo ; lorsque la solution perfusée est hypo-osmotique, l'hémolyse observée est plus faible avec un soluté de PF-68 qu'avec une solution de chlorure de sodium de même abaïssement cryoscopique.

Organes isolés : Sur le muscle lisse intestinal, les trois polymères dépriment la motricité spontanée et la suppriment tous les trois à forte concentration. Cependant, le PF-68 semble le plus toxique car la récupération est mauvaise dès la concentration 10 p. 100.

L'inhibition des contractions provoquées par l'acétylcholine et le baryum est observée avec les trois polymères. Seules des différences quantitatives interviennent. Le PF-68 agit à faible concentration et est caractérisé par une mauvaise récupération de l'organe. Le PEG 6000 n'agit qu'à forte concentration et la récupération est bonne. La PVP 11000 agit à concentrations moyenne et forte, et la récupération est toujours excellente. Dans tous les cas on note un bon parallélisme entre les effets vis-à-vis du baryum et l'action sur les contractions à l'acétylcholine. Il n'y a donc pas de distinction entre les agents spasmogènes musculotropes et neutotropes, ce qui indique que c'est le phénomène musculaire contractile lui-même qui est influencé, et non la commande de la contraction.

Au niveau du nerf isolé, les trois polymères influencent la conduction dans le même sens. Dans l'ensemble, on observe une augmentation du seuil, une diminution de l'amplitude (sauf avec PEG 6000 à faible dose), une diminution de la vitesse de conduction et une augmentation des périodes réfractaires. Cependant, seuls PF-68 et PEG 6000 aboutissent à un arrêt total, réversible par lavage.

Sécrétion biliaire : In vivo PEG 6000 et PF-68 manifestent une action biphasique sur le débit biliaire ; hypocholérèse suivie d'une hypercholérèse. PVP 11000 est immédiatement cholérétique. L'excrétion supplémentaire de bile est reliée à la dose pour PVP 11000, non reliée à la dose pour PEG 6000 et PF-68.

Oxalose rénale : Lorsque les polymères sont administrés in vivo à des rats porteurs d'une néphrite tubulaire créée par l'éthylène-glycol, on observe une forte aggravation des lésions avec PF-68 et PEG 6000, et pas d'action de PVP 11000. Les lésions de néphrose osmotique observées, très fortes avec PF-68, moindres avec PEG 6000, sont presque inexistantes avec PVP 11000, les doses étant égales en poids dans les trois cas.

Tous ces faits expérimentaux sont résumés dans le tableau LXXII.

II.— STRUCTURE DE L'EAU DANS LES SYSTEMES BIOLOGIQUES.

Les caractères structuraux de l'eau liquide dépendent principalement de la possibilité pour la molécule d'eau de participer à plusieurs liaisons hydrogène (1 à 4), en mettant en jeu ses deux hydrogènes et les deux paires solitaires de l'oxygène. Dans beaucoup de structures, l'eau atteint sa coordination maximale

(tétracoordination) ; c'est en particulier le cas de la glace, à 0° C. et 1 atmosphère. Lorsque la glace fond, il existe encore un haut degré de liaison hydrogène dans la forme liquide. On a proposé pour l'eau liquide un modèle dans lequel des amas de molécules tétracoordinées forment des petits "grumeaux" entourés de molécules libres (SCHERAGA, 1965). Il y a probablement une distribution de taille pour ces amas, mais pour simplifier on peut supposer que les groupes tétracoordinés sont de taille uniforme, cette taille étant variable avec la température. Il y a donc deux structures principales : les molécules libres et les amas. Cependant, les molécules considérées individuellement peuvent être engagées dans 1, 2, 3 ou 4 liaisons hydrogène. Les monomères constituent une classe et les quatre autres classes se trouvent dans les amas ; tétracoordinées au centre de l'amas, et tri, di et monocoordinées en surface. Un niveau d'énergie peut être assigné à chaque classe, l'état basal étant à 4 liaisons H, et l'énergie augmentant au fur et à mesure de la rupture des liaisons H.

Dans un autre modèle, la structure quasi-cristalline ressemble à un réseau du type clathrate, c'est-à-dire à mailles très larges, stabilisé par la présence de monomères OH₂ interstitiels.

Lorsqu'une molécule dissoute non polaire est introduite dans l'eau liquide, il semble que l'équilibre soit déplacé dans le sens d'une plus grande structuration de l'eau (FRANKS, 1965). Au contraire les corps et groupements ioniques auraient plutôt une action déstructurante (voir : SCHMITT, 1960). Quoiqu'il en soit il semble qu'actuellement on ne puisse pas encore prédire la structure d'une solution et la distribution du solvant et du corps dissous dans la solution d'après les propriétés de ces deux constituants. Les propriétés des solutions ne sont déterminées qu'expérimentalement (OWE BERG, 1965).

Dans les solutions de macromolécules, il est particulièrement intéressant de connaître les propriétés de l'eau "liée", forme d'eau qui doit être évoquée chaque fois que les propriétés physiques d'une solution macromoléculaire ne peuvent pas être convenablement expliquées par les propriétés du solvant et par celles des macromolécules.

SCHWAN (1965) a étudié les propriétés diélectriques de solutions d'hémoglobine et de suspensions d'hématies lysées par l'eau distillée. La constante diélectrique (1) d'une suspension d'hémoglobine à 10 p.100 décroît assez fortement quand la fréquence augmente (entre 0,5 et 150 Mc). Cette variation peut être expliquée par des variations de propriétés de l'eau liée. Celle-ci se comporte d'une façon intermédiaire entre l'eau libre et la glace. D'après des mesures de conductance à ces fréquences, SCHWAN arrive à des valeurs de $0,3 \pm 0,1$ g d'eau liée par gramme d'hémoglobine dans le cas d'une solution à 20 p. 100 d'hémoglobine.

Quant à la structure de l'eau se trouvant au voisinage immédiat des surfaces macromoléculaires, on peut émettre, spécialement dans le cas des protéines, un certain nombre d'hypothèses. Les chaînes latérales polaires s'hydratent vraisemblablement individuellement, mais ont une influence de désorganisation structurale, au-delà de la première couche. Les chaînes latérales non polaires, au contraire, vont entraîner une augmentation de la structure ordonnée (de type cage ou clathrate), comme le font les hydrocarbures.

(1) La constante diélectrique se définit à partir de la loi de Coulomb, qui exprime la force d'attraction existant entre charges de signes contraires dans un milieu :

$$F = \frac{1}{K} \cdot \frac{ee'}{d^2}$$

F = force d'attraction, e, e' = charges de signes contraires,

d = distance séparant les charges, K = constante diélectrique.

(d'après BENEZECH, 1958).

Les structures du squelette ne comportant pas de donneurs ou d'accepteurs de liaisons H (comme l'hélice α) se comporteront comme des corps dissous non polaires.

Les structures du squelette moléculaire susceptibles de former des liaisons H avec l'eau peuvent avoir des effets favorables ou défavorables à la structuration, selon la géométrie des sites formant des liaisons H. Si cette géométrie est compatible avec un réseau du type glace I, une stabilisation des formes structurées est vraisemblable ; il en est de même si d'autres formes normales d'eau peuvent se loger dans les sites formant les liaisons H. Avec des chaînes hydrophiles, des effets semblables peuvent se produire si de courtes chaînes latérales se répètent selon un schéma s'adaptant à un réseau normal de l'eau. Les effets seront marqués pour des squelettes rigides et des chaînes latérales.

Il est à noter que ces phénomènes ne sont pas exactement décrits par les termes hydrophile et hydrophobe : des groupes polaires et une tendance à former des liaisons H avec l'eau rendent une structure plus hydrophile, tandis que les phénomènes de structuration rendent une surface plus hydrophobe (BERENDSEN et MIGCHELSEN, 1965). L'arrangement des molécules d'eau est très différent selon les cas : ainsi dans le collagène, l'eau est dans un état intermédiaire entre les états solide et liquide, et semble arrangée en files moléculaires parallèles à la direction de la fibre de collagène. Au contraire, dans la fibroïne de la soie, le DNA de sperme de saumon et les kératines du poil, les molécules d'eau semblent plus mobiles et moins structurées (mesures de R.M.N.).

Certains auteurs ont observé que l'effet des sels neutres sur la dénaturation des protéines et du DNA est très comparable, pour des corps aussi différents que le collagène, la ribonucléase, le DNA et la myosine. Le mécanisme commun serait l'effet des ions sur la structure du solvant, ce qui modifie les interactions macro-molécules/solvant nécessaires à la stabilité des structures natives. Les sels suivants ont été classés en fonction de leurs effets stabilisants sur la structure native, des plus stabilisants aux plus déstabilisants :

Phosphate de K — $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ — NaCl — KCl — LiCl — NaBr — LiBr — CaCl_2 — SCNK.

Le phosphate qui se trouve à l'extrême gauche de la série détruit la structure organisée de l'eau autour du collagène ; le sulfate d'ammonium également. Au contraire, NaCl et SCNK n'ont pas d'influence appréciable aux faibles concentrations.

Ceci signifie qu'un effet de désorganisation de l'eau liée à une macromolécule correspond à une stabilisation de la conformation native de cette molécule. Des considérations thermodynamiques indiquent que l'augmentation d'entropie au cours de la dénaturation est moins élevée en présence d'un agent désorganisant la structure de l'eau ; la dénaturation a donc moins tendance à se produire puisque l'augmentation d'entropie est plus faible.

La diffraction des rayons X a montré que la sérualbumine est entourée par une couche d'eau qui ne dissout pas le saccharose aussi bien que l'eau normale. Dans le cas du DNA, divers auteurs sont arrivés à la conclusion que l'eau associée de près à la molécule exclut les ions métalliques alcalins (in LING, 1965).

Que se passe-t-il en fait dans la cellule ? Les vues sont assez divergentes. Dans la théorie classique des membranes, il est admis implicitement que l'eau intracellulaire est de façon permanente et presque entièrement sous la forme d'eau normale telle qu'on la trouve par exemple dans une solution de KCl environ 0,15 M. La distribution asymétrique des ions et des nonélectrolytes de part et d'autre de la membrane est attribuée aux propriétés de pompage et aux pores de la membrane. D'autres conceptions considèrent que l'eau cytoplasmique n'est

pas sous un état physique unique défini, mais existe sous plusieurs formes métastables, réversibles selon l'état d'activité physiologique. Pour LING (1965), la plus grande partie de l'eau cellulaire existe sous forme de multicouches polarisées, orientées sur les surfaces des molécules de protéines cellulaires. Des études portant sur le transport des ions dans le muscle de grenouille aboutissent pour cet auteur à la conclusion que les ions alcalins étudiés ne s'accumulent pas dans les cellules selon un équilibre de Donnan ; par contre, ces résultats ne sont pas en contradiction avec le modèle "association-induction" c'est-à-dire l'adsorption ionique sur les protéines cellulaires et leur exclusion partielle de l'eau cellulaire (LING et OCHSENFELD, 1966). Ainsi, pour ces auteurs, la distribution des ions et des non électrolytes dans l'eau cellulaire est, en règle générale, plus faible que dans l'eau extra-cellulaire.

Le rôle de la température est sans doute important. En effet, lorsqu'on examine attentivement les propriétés physiques de l'eau liquide en fonction de la température, on trouve de nombreux points d'inflexion sur les courbes représentant ces variations. En particulier, aux températures de 15, 30, 45 et 60° C environ, donc dans le domaine biologique, se manifestent de telles anomalies structurales. On a pu considérer que ces anomalies influençaient de façon importante le comportement des systèmes biologiques, et qu'elles délimitaient les températures optimales et minimales pour l'activité biologique. On notera ainsi que la zone 37-38° C se trouve sensiblement au milieu de l'intervalle 30-45° C (DROST-HANSEN, 1965).

Les biochimistes et les biologistes moléculaires qui commencent à s'attaquer aux problèmes de structure et de composition du cytoplasme fondamental, c'est-à-dire de la phase continue soluble de la cellule, utilisent généralement des méthodes d'extraction. Ces méthodes n'ont sans doute que peu d'avenir en ce qui concerne l'étude directe de l'eau hyaloplasmique, mais elles peuvent certainement apporter des précisions sur d'autres questions : la composition biochimique par exemple.

La phase soluble de la cellule est définie dans les méthodes d'extraction comme le surnageant limpide obtenu après centrifugation de toutes les particules cellulaires. La question essentielle à poser à propos de cette phase soluble obtenue par centrifugation *in vitro* d'homogénats cellulaires est de savoir dans quelle mesure cette fraction isolée représente la réalité du fluide interparticulaire de la cellule, c'est-à-dire du hyaloplasme. Pour résoudre cette question il faudrait d'abord savoir si chacune des fractions cellulaires, particulières ou non, peut être séparée de façon convenable, et d'autre part si des échanges interviennent entre les diverses fractions au cours des processus de séparation. La question la plus délicate est celle des liaisons faibles existant vraisemblablement *in vivo*. Ainsi, certains complexes de forte taille ont été décrits dans les cellules : thyroglobuline-19S,

α - cétoglutarate deshydrogénase-36S, complexe 58S déshydrogénant le pyruvate, ainsi que des agrégats réversibles de systèmes enzymatiques solubles (in ANDERSON et GREEN, 1967). De telles liaisons labiles sont sans doute beaucoup plus générales que les quelques exemples actuellement décrits, et les changements de viscosité du cytoplasme pourraient être en rapport avec ces agrégations moléculaires. Certaines expériences *in vitro* confirment ces vues, comme la formation spontanée de structures particulières dans des préparations de phase cytoplasmique soluble (ANDERSON, 1959).

Lorsqu'on observe la composition de la phase soluble dans un schéma comme celui d'ANDERSON et GREEN (1967), on note qu'entre le domaine des micro et des mésomolécules (selon la nomenclature de ces auteurs), dont les masses vont de 20 à 10.000 daltons (1) environ, il existe une classe apparem-

(1) - 1 Dalton = 1/16 de la masse de l'atome d'oxygène.

ment peu peuplée : la zone 10^3 à 10^4 daltons. On peut se demander si cette discontinuité tient aux méthodes analytiques employées, qui sont souvent assez imprécises dans la zone de masses moléculaires considérées, ou à une réelle pauvreté de la matrice cytoplasmique en ces molécules. Dans ce dernier cas, s'agit-il d'une coïncidence, ou bien plutôt d'un impératif physique dû à ce que les molécules de cette taille interfèrent avec les molécules d'eau d'une façon peu favorable aux processus biologiques normaux? On notera que les polymères que nous étudions se situent précisément dans cette classe de tailles moléculaires.

Les données sur la physiologie de la phase soluble sont extrêmement rares. On sait cependant que les protéines de la phase soluble du foie, chez le Rat, sont très sensibles à la température entre 30 et 50° C, c'est-à-dire une zone centrée autour de la température normale du vivant. Ainsi, à 40° C, environ 10 p. 100 de l'azote total précipite en deux heures ; cette précipitation est influencée par le pH : elle diminue quand celui-ci passe de 6,4 à 8,2 (ANDERSON et Coll, 1961). L'A.T.P. empêche la formation du précipité, mais cet effet disparaît au cours de l'incubation, peut-être à la suite de l'hydrolyse de l'A.T.P. L'addition de polyanions (R.N.A., héparine, acide polymanuronique sulfaté) décroît fortement la précipitation ; un effet stabilisant de ces corps peut donc être évoqué, et nous émettons l'hypothèse qu'il peut s'agir d'une modification de la structure de l'eau tendant soit à diminuer les réactions enzymatiques ou la dénaturation thermique, soit à maintenir en place des groupements ou des substances protectrices. Il faut cependant rappeler que ces phénomènes sont observés dans une phase soluble préparée en saccharose 0,25 M, c'est-à-dire un milieu aussi éloigné que possible des conditions physiologiques *in situ*. On peut donc se demander si ces phénomènes ont vraiment un rapport avec les changements physiques de la substance fondamentale au cours du mouvement amiboïde, de la division cellulaire, de la fécondation, etc... (ANDERSON et GREEN, 1967).

III.— LES MODIFICATIONS STRUCTURALES DE L'EAU, HYPOTHESE POUR UN MODE D'ACTION UNITAIRE DES POLYMERES.

Compte-tenu des données physico-chimiques que nous venons de rappeler brièvement, nous allons essayer d'interpréter nos résultats expérimentaux dans l'optique d'une action de structuration ou de déstructuration du réseau de l'eau par les molécules de polymères. Il convient d'être très prudent en évoquant le sens d'une telle action, car les conclusions obtenues par différents auteurs ne semblent pas toujours reliées par une logique évidente. Ainsi FRANKS (in SCHMITT, 1960) indique que tous les corps dissous ioniques, ainsi que les groupements fonctionnels ioniques (zwitterions des acides aminés par exemple) semblent avoir une action à tendance déstructurante, vraisemblablement parce qu'à une certaine distance de la charge, le couple exercé sur un dipôle d'eau est à peu près égal à la force du couple compétitif exercé sur cette molécule d'eau par ses voisines, ce qui a pour résultat l'apparition d'une zone de désordre. Cependant, quand l'ion est petit ou fortement chargé (Li^+ , Mg^{++} , Al^{+++}), une autre influence se fait sentir : la création d'une zone structurée autour de la charge. Dans de tels cas l'effet net de l'ion peut être structurant. Les très gros ions organiques peuvent être également structurants, en raison des groupes non polaires qu'ils portent. Ceux-ci, comme les molécules non polaires, ont un effet structurant que certains attribuent à la formation de clathrates, d'autres à la faiblesse du champ de forces entourant une molécule non polaire qui, n'ayant aucune propension à contrarier la tendance normale à l'orientation des molécules d'eau, améliorerait l'efficacité de cette structuration.

D'autres auteurs ont montré que la destruction par des ions minéraux de l'eau liée à une macromolécule correspond à une stabilisation de la conformation native de cette molécule, résultat qui ne semble pas évident au cours d'un raison-

nement logique élémentaire (BERENDSEN et MIGCHELSEN, 1965).

Nous ne formulerons donc que des hypothèses, acceptables sous réserves de vérifications expérimentales ultérieures, pour l'instant hors de notre portée. Les résultats physico-chimiques, tout d'abord, indiquent indiscutablement une liaison forte de l'eau avec les polymères. Ainsi, lors de déterminations cryoscopiques, les poids moléculaires calculés en solutions aqueuses sont systématiquement plus faibles que par d'autres méthodes. Comme il n'y a aucune raison de supposer une dissociation des molécules dans l'eau, on peut envisager une modification de la concentration apparente. Une augmentation de concentration peut en effet être réalisée de deux manières : en augmentant la quantité du corps dissous, ou en diminuant la quantité de solvant. Tout se passe comme si la quantité de solvant était plus faible que celle qui est réellement présente, ce qui incite à conclure à la présence d'une certaine quantité d'eau liée, non solvante, autour des chaînes de polymères. De plus, le coefficient osmotique ⁽¹⁾ des solutions de polymères (estimé d'après la cryoscopie) croît avec la concentration, surtout pour PF-68 et PEG 6000, c'est-à-dire qu'une certaine quantité de polymères abaisse d'autant plus le point de congélation de la solution que le niveau global de concentration est plus élevé. En d'autres termes, on peut supposer que la quantité d'eau non solvante associée à chaque molécule de polymère est d'autant plus forte que la concentration du polymère est élevée. Cependant, GREMY et PAGES (1962) font remarquer que, tout au moins dans le cas des solutions de protéines, l'écart au comportement idéal est surtout dû à l'entropie de mélange, et accessoirement seulement à l'hydratation et à la fixation d'ions.

Nous ne ferons que signaler ce fait car l'entropie de mélange est une grandeur trop abstraite pour que nous puissions la discuter valablement ; il semble qu'elle soit en relation avec la configuration spatiale des particules en présence. Quel que soit le rôle partiel de ces différents phénomènes, nous les grouperons sous le terme intuitif et sans doute abusif de solvation ou hydratation des polymères, puisque la décomposition en effets partiels nous est inaccessible. Cette dénomination sera conservée par commodité, pour permettre de désigner sous un terme simple des phénomènes en désaccord avec les propriétés colligatives dites "théoriques" de la solution (c'est-à-dire calculées d'après le poids moléculaire en appliquant à des solutions concentrées des lois valables seulement pour des solutions idéales diluées).

En accord avec ces hypothèses d'hydratation, les mesures de concentration efficace de sodium dans des solutions mixtes polymères-chlorure de sodium indiquent une concentration apparente plus forte que la quantité de sodium réellement présente. Tout se passe comme si une partie du volume de la solution ne dissolvait pas le sodium, entraînant une augmentation de sa concentration dans la phase solvante restante. Il est tentant de faire coïncider cette fraction de l'eau non solvante pour le sodium avec l'eau hydratant les chaînes de polymères. Toutefois, l'activité sodium paraît augmentée de façon similaire pour les trois polymères, alors que l'augmentation du coefficient osmotique avec la concentration est surtout observée pour PF-68 et PEG 6000. Il convient d'indiquer que nos mesures ne prétendent pas être absolument quantitatives, et nous jugeons plus sage à l'heure actuelle de les considérer comme une indication sur le sens de l'effet,

(1) Le coefficient osmotique est défini comme le rapport de la pression osmotique mesurée expérimentalement à la pression "théorique" (calculée à partir des concentrations expérimentales en utilisant une loi valable pour les solutions idéales diluées) - in GREMY et PAGES, 1962.

plus qu'une expression rigoureuse de cet effet. Il faudrait à ce propos, d'une part reprendre et étendre les mesures cryoscopiques avec des méthodes plus précises et plus rapides, utilisant par exemple un système de détermination du point de congélation semi-automatique, sur micro-échantillons et avec enregistrement graphique (LUCARAIN, 1962) ; d'autre part, utiliser une série de polymères soigneusement purifiés et contrôlés par une équipe de chimistes pour partir de bases plus sûres ; enfin, reprendre les mesures d'activité en grandes séries, dans des domaines de concentrations variées, à températures variées (en particulier au voisinage des températures auxquelles les propriétés de l'eau montrent des points d'inflexion ; DROST-HANSEN, 1965), et en utilisant des sels influençant de manières diverses la structuration de l'eau, des phosphates, très stabilisants, aux sulfocyanures, très déstabilisants (BERENDSEN et MIGCHELSEN, 1965).

Le relargage des sels minéraux aux fortes concentrations, avec séparation de phases liquides, est également compatible avec l'interprétation de l'eau non solvante liée aux polymères que nous venons d'exposer ; il est également observé avec les trois polymères.

La formation de gels in vitro en présence de fortes concentrations ioniques, est plus difficile à expliquer. Le phénomène est obtenu uniquement avec PF-68, et il est tentant de le rapprocher de la propriété unique de ce corps de posséder des groupes lipophiles avec des chaînes latérales méthyle. De tels groupements non polaires sont réputés posséder un effet structurant sur les molécules d'eau voisines (SCHMITT, 1960) ; les ions voisins sont soit déstructurants, soit structurants, s'ils sont petits ou fortement chargés. L'expérience indique que les ions sodium et chlore doivent remplir des conditions de taille convenable pour stabiliser la structure du gel, puisque la gélification est plus faible si l'ion est plus petit (Li^+), ou plus grand (K^+). Cependant la dépendance thermique du phénomène est difficile à expliquer. A 40°C , la formation de gels est plus difficile qu'à 37°C . Or, l'augmentation de température implique en principe une déstructuration plus marquée du réseau de l'eau. La structure tétracoordinée, maximale à froid, serait donc peu favorable à la géométrie du réseau complexe qui se forme finalement, tandis qu'à une température un peu plus forte, cette géométrie s'accommoderait mieux des amas moléculaires moins importants alors obtenus.

Dans le cas des sels donnant des gels partiels, comme les sulfates, il semble que se forme un réseau plus condensé duquel est exclu une partie de l'eau de la solution, qui sort alors du gel pour former une phase liquide. Le rayon effectif des ions solvatés à ces différentes températures devrait sans doute également être pris en considération pour établir une théorie plus solide. Dans ce domaine aussi, de nombreuses expériences nouvelles pourraient être imaginées, en utilisant en particulier des mesures de viscosité, qui donneraient une idée sur la cinétique du phénomène, et aussi sur la pente de la variation en fonction de la température. Elles permettraient de savoir si des variations de viscosité surviennent en solutions plus diluées, avant que la structuration ne soit suffisante pour donner une phase solide.

Les résultats obtenus sur les hématies isolées amènent d'autres interprétations, car on se trouve ici expérimentalement en présence d'une membrane réelle. Jusqu'à présent, l'emploi du terme "osmotique" pour caractériser les propriétés d'une solution était un abus de langage, puisque ce terme indique implicitement l'existence d'une membrane, celle-ci étant imperméable au corps dissous. Cette membrane est maintenant présente, et elle a en plus toute la complexité d'une membrane cellulaire vivante. On peut considérer a priori que les molécules de polymères ne la traversent pas, en se basant sur l'emploi du PEG et du pluronic comme marqueurs non absorbés par la muqueuse intestinale (BORGSTROM, 1957) et sur la non pénétration de ces corps dans les hématies (GLAUSER et TALBOT,

1956). Par contre, il est fort possible que les polymères modifient la perméabilité de la membrane de l'hématie, en se fixant sur elle, ou (et) en déterminant dans son voisinage une atmosphère moléculaire différente du reste de la solution.

Première constatation : les molécules essayées ne sont pas hémolytiques par elles-mêmes, c'est-à-dire que leur configuration moléculaire n'amène pas au niveau de la membrane des changements structuraux tels qu'ils se traduisent par la libération de l'hémoglobine intra-cellulaire. Cependant, à très fortes concentrations, la structure cellulaire est altérée, comme l'indique l'examen microscopique, spécialement avec le PF-68. Même alors, l'hémoglobine n'est pas libérée dans le surnageant ; ceci implique que les molécules protéiques sont fixées sur les résidus cellulaires sous une forme insoluble, et nous suggérons que cette forme est une condensation par une véritable déshydratation en milieu liquide, sous l'influence de la phase riche en polymère avide d'eau.

Deuxième constatation expérimentale : en présence d'une phase extérieure constituée de solution de chlorure de sodium, contenant en plus des quantités faibles ou moyennes de polymères, tout se passe comme si la résistance des globules à l'hypotonie était augmentée, nettement avec PF-68 et PEG 6000, beaucoup moins avec PVP 11000.

Diverses interprétations peuvent être avancées : parallèlement aux mesures obtenues sur des mélanges polymères/CINa, nous pouvons imaginer que le sodium est exclu d'une partie du volume de l'eau extracellulaire, entraînant une concentration apparente en petite molécules du milieu, avec recul du point d'hémolyse 50 p. 100 ; on peut également envisager que des ions sortent de l'hématie pour venir dans le milieu, ce qui rend le milieu intracellulaire hypotonique et explique l'apparente augmentation de résistance osmotique. Cette deuxième hypothèse peut faire intervenir divers mécanismes : un équilibre de DONNAN est peu vraisemblable puisque les polymères ne sont pas véritablement chargés et ne doivent donc pas attirer les ions par un mécanisme électrostatique, et surtout parce que in vitro les polymères semblent éliminer le sodium aux dépens des molécules d'eau et en tous cas présentent des propriétés cryoscopiques anormales sans qu'il y ait aucune possibilité d'équilibre de DONNAN.

Un deuxième mécanisme à envisager est l'arrêt des métabolismes dans la membrane, entraînant une fuite passive de potassium, comme cela s'observe par exemple en présence de fluorure de sodium, de Pb^{++} , etc... (PASSOW, 1964). Cependant, un tel phénomène est lent : il faut trois ou quatre heures à 37° C pour observer cet effet avec FNa, et il semble peu vraisemblable que 30 minutes à 37° C suffisent pour que le transfert ionique soit suivi d'un effet sur la tonicité du milieu interne de l'hématie.

Cependant, des auteurs déjà anciens (MAIZELS, 1935 ; DAVSON, 1939 ; WILDBRANDT, 1940, in PASSOW, 1964) ont montré que lorsqu'une partie de la solution saline externe est remplacée par une solution iso-osmotique d'un non électrolyte non pénétrant, comme le mannitol ou le saccharose, le potassium et le sodium quittent rapidement les cellules. Un phénomène analogue pourrait donc être envisagé.

Troisième hypothèse : des molécules de polymère s'associent à l'hématie au voisinage immédiat de la membrane en formant une atmosphère particulière dans cette zone. Cette hypothèse est soutenue par les constatations de MAC VICKAR (1949) qui supposent une fixation du PEG 4000 sur l'hématie ; elle s'accorde avec la conception d'une atmosphère d'eau suffisamment liée au polymère pour que son potentiel chimique (1) soit abaissé par rapport à l'ensemble de

(1) Nous ne ferons appel que très superficiellement à la notion de potentiel chimi-

la solution : elle permet enfin d'expliquer la consolidation de la membrane qui semble découler de nos mesures de volume. Dans ces expériences, l'adjonction de polymères à des solutions hypo ou hypertoniques de chlorure de sodium modifie peu le volume des globules ; pour PF-68 et PEG 6000, le polymère agit nettement moins sur le volume que sur le recul du point d'hémolyse 50 p. 100. Cela signifie que lorsque la moitié des globules atteignent le point de fuite mécanique de l'hémoglobine, leur volume est plus grand en présence du polymère qu'en son absence. Il paraît donc logique de conclure à une augmentation de la résistance mécanique de membrane, à moins que la fixation d'une atmosphère très dense de polymère autour de l'hématie n'interfère dans la méthode de l'hématocrite en masquant partiellement la diminution de volume. Cette dernière hypothèse paraît cependant peu vraisemblable.

Enfin, le volume semble relié à la concentration en polymère par une loi relativement linéaire, alors que pour les électrolytes comme ClNa , la loi est linéaire en fonction de l'inverse de la concentration. Ces faits expérimentaux deviennent acceptables dans l'hypothèse d'une fraction d'eau non solvante liée aux polymères devenant de plus en plus forte avec la concentration, comme le coefficient osmotique.

L'hémolyse à la saponine indique un faible effet des polymères, dans le sens d'une protection pour PEG et PVP, et de sens inverse pour PF-68. Cette dernière action peut être mise en rapport avec la présence de groupements lipophiles dans le PF-68, qui lui confèrent un caractère de détergent que n'ont pas les autres molécules. Nous avons discuté ailleurs (DEBRAY et Coll., 1967 a) de l'action de la saponine sur les hématies de Rat et d'Homme. Rappelons seulement que pour certains auteurs, les saponines se lient aux albumines du plasma sanguin, ce qui abaisse considérablement l'intensité de leur action hémolytique. Dans le cas du PEG et de la PVP, une liaison avec la saponine doit donc être évoqué avant de conclure à une action protectrice de ces produits au niveau de la membrane elle-même.

L'hémolyse en présence de lysocithine explore également l'action proprement membranaire des polymères, qui n'est qu'une composante accessoire du phénomène de fixation de l'eau qui nous intéresse principalement. Comme avec la saponine, le petit effet protecteur observé pourrait être dû éventuellement à une fixation de la lysocithine sur le polymère plus qu'à une véritable protection de la membrane; nos expériences ne permettent pas de conclure sur ce point. Notons toutefois qu'une absence d'effet des polymères dans ces conditions n'irait pas à l'encontre des hypothèses précédentes, car on peut concevoir que la présence d'une atmosphère d'eau structurée autour de la membrane soit peu active pour empêcher son attaque directe par des agents énergiques comme la saponine.

Le pouvoir protecteur partiel contre les lésions de la congélation-décongélation semble pouvoir s'interpréter commodément dans l'optique des hypothèses précédentes. Une forte quantité de polymères est nécessaire, et l'on peut supposer qu'à ce moment toute l'eau extra-cellulaire est convenablement restructurée autour des chaînes de polymères, ce qui entraîne des modifications moins brutales de structure au moment des changements de phase produits par les variations

(1) (suite)

que. Cette grandeur thermodynamique abstraite (dérivée partielle de l'enthalpie libre par rapport à la concentration molaire) a la dimension d'une énergie par mole. Elle exprime la tendance d'un constituant à quitter la phase où il se trouve. Dans le cas d'un solvant, le potentiel chimique est diminué par la présence d'un corps dissous, augmenté si on accroît la pression ou la température (in GREMY et PAGES, 1962).

de température. Mais comme les polymères ne pénètrent pas dans la cellule, tant que la membrane est intacte, le problème de la structure de l'eau intra-cellulaire se pose différemment. Si la concentration externe en polymères est faible, l'eau intra-cellulaire est peu modifiée et il n'y a pas de protection contre la congélation-décongélation ; si la concentration externe en polymère est suffisante, une partie de l'eau quitte la cellule, et la structure restante devient résistante aux lésions du froid. Mais on se trouve alors en présence de lésions de déshydratation dues aux polymères eux-mêmes, et il n'a pas été possible jusqu'à présent de trouver une zone de sécurité pour les cellules, en dehors de ces deux dangers liés à la concentration.

En ce qui concerne l'interaction avec les virus, le PF-68 ne s'est pas montré capable dans nos expériences d'inhiber in vitro l'hémagglutination par un myxovirus : il n'y a donc ni fixation du myxovirus sur le polymère, ni destruction ou occupation des récepteurs mucoprotéiques de la membrane par les chaînes hydrophiles-lipophiles. Dans ces expériences nous avons employé des concentrations modestes de polymères, de manière à être dans une zone de non altération des structures cellulaires. Par ailleurs l'injection intra-péritonéale au Cobaye de fortes doses de solution de PF-68, est incapable d'entraver la multiplication du virus de la fièvre aphteuse inoculé dans le coussinet plantaire (J.A. THOMAS, communication personnelle). Ces faits ne paraissent pas en désaccord avec les hypothèses avancées précédemment, car d'une part l'effet membranaire ne représente qu'une composante accessoire de l'effet principal supposé sur les caractéristiques physiques du milieu ambiant, d'autre part, dans les expériences in vivo, il n'y a pas de contact direct entre le virus et la solution dont les propriétés physiques sont modifiées. Une fois que le virus a pénétré dans la cellule, il y a fort peu de chances pour influencer son développement par un agent qui reste surtout extracellulaire. De plus, la résorption du polymère à partir de la cavité péritonéale est lente, comme l'indique la formation transitoire d'une ascite gélatineuse après l'injection.

Les résultats décrits ensuite ont été obtenus sur des organes isolés. La motricité du muscle lisse intestinal est inhibée par l'addition de fortes doses de polymères dans le milieu de survie. Cette action se manifeste aussi bien sur les mouvements spontanés que sur les contractions induites par l'acétyl-choline et le chlorure de baryum. Ceci incite à conclure que l'action porte sur le mécanisme fondamental de la contraction, et non pas sur un de ses stades intermédiaires, comme par exemple la transmission neuro-humorale. En effet, si l'action était de type neurotrophe, les contractions au chlorure de baryum ne seraient pas inhibées. Notons que de fortes concentrations en polymères doivent être nécessaires pour l'action, qui est donc bien un phénomène de type physique, car in vivo, nous n'avons pas réussi à arrêter l'électrogenèse et la motricité spontanée du côlon distal de Lapin, en perfusant à l'animal 60 ml de solution à 10 p. 100 de PF-68, le contrôle étant fait par électromyographie in situ (COUTURIER, ROZE et Coll., 1969).

Ces effets peuvent être interprétés comme des phénomènes d'hypertonie simple, puisqu'il est possible de les reproduire, bien que d'une manière quantitativement différente, en utilisant dans le bain à organes des concentrations fortes de sels minéraux. Cependant, nous pensons qu'ils conservent leur valeur car ils sont obtenus avec la quantité d'ions minéraux normale pour l'organe. De plus l'emploi du terme hypertonie n'explique rien en ce qui concerne le mécanisme intime de l'action. Nous aurions pu diminuer la quantité de sels minéraux du milieu pour compenser l'augmentation de tonicité due aux polymères ; nous ne l'avons pas fait car les conditions de déficience ionique ainsi créées auraient été tout aussi anormales pour l'organe. Enfin et surtout, certains effets observés in vivo, en particulier sur le cholérèse, subsistent en solution isoosmotique et même hypo-

osmotique, ce qui indique un mécanisme différent de l'hypertonie simple. D'autres auteurs (SALACH et GERSHBEIN, 1968) ont aussi obtenu une action pour des doses plus faibles de PEG.

Un effet anticholinestérasique ne semble pas pouvoir être évoqué, du fait de la suppression des spasmes à l'acétyl-choline, alors qu'un produit anticholinestérase les augmenterait. L'action obtenue est presque immédiate, ce qui laisse à penser que les zones sensibles aux effets du polymère sont très externes, et viennent rapidement en contact direct avec lui. C'est en effet la couche musculaire longitudinale externe qui est étudiée par la méthode de myographie isotonique employée.

On sait encore assez peu de choses sur les mécanismes de transmission du processus de contraction dans les cellules du muscle lisse intestinal. Cette transmission se fait vraisemblablement directement de cellule à cellule, en particulier par l'intermédiaire des nexus, zones de liaison particulièrement entre les cellules musculaires lisses (voir : DEWEY et BARR, 1962 ; COUTURIER, 1968). Quoi qu'il en soit, nos constatations militent en faveur d'une participation importante de la zone immédiatement externe de la couche musculaire longitudinale externe du duodénum dans la conduction de la contraction. Il est en effet peu vraisemblable que les polymères puissent diffuser aussi rapidement jusqu'au contact de toutes les fibres lisses de la couche. Le passage par le côté muqueux semble exclu, puisque les études *in vivo* montrent que les polymères sont très peu absorbés par le tractus digestif. Un autre mécanisme, plus vraisemblable, peut être évoqué ; c'est celui d'un appel rapide d'eau à travers les membranes les plus périphériques vers la solution, suivi ensuite de proche en proche de passage du même type d'une cellule dans l'autre. Un rôle de l'équilibre ionique est possible ; cependant, nos expériences montrent que l'intervention d'une complexation du magnésium est peu vraisemblable. D'autres ions non étudiés peuvent éventuellement intervenir.

La réversibilité par lavage est différente selon les polymères : elle est, dans l'ordre suivant, de moins en moins bonne pour PVP 11000, PEG 6000 et PF-68. Cet ordre coïncide avec les notions déjà obtenues sur les effets membranaires et la précipitation des protéines. PF-68 agit davantage sur les membranes, sans doute en raison de ses groupements lipophiles qui le différencient des autres molécules ; PEG 6000 se fixe moins, tandis que PVP 11000 semble dépourvue d'action membranaire directe. La réversibilité des effets par lavage peut donc être mise en relation avec la fixation sur les membranes, le lavage étant d'autant plus difficile que la fixation est plus forte. Des lésions parfois irréversibles sont sans doute créées par les fortes concentrations des agents fixés, leur mécanisme pouvant relever de la déshydratation cellulaire excessive.

Dans ce domaine, des recherches ultérieures pourraient être faites en utilisant par exemple des techniques d'électromyographie *in vitro* comme celles proposées par GONELLA (1967). On pourrait alors rechercher si la présence de polymères hydrophiles dans le milieu altère le processus électrique de conduction (ondes lentes), comme le processus de la contraction ; et si l'effet est dû à un arrêt total de l'activité cellulaire étudiée par microélectrodes, ou si plutôt chaque cellule est encore capable d'émettre des potentiels d'action, mais incapable de transmettre l'excitation à sa voisine.

Les modifications de conduction dans le nerf isolé de Batracien fournissent des renseignements complémentaires, mais non identiques. La lenteur des effets est caractéristique ; elle contraste avec la rapidité de l'action sur le muscle, dans des conditions d'étude *in vitro* voisines. Sans doute ici la gaine du nerf est-elle moins perméable, et l'association histologique dense des fibres, ainsi que les gaines de myéline, s'opposent-elles à des mouvements rapides de l'eau. S'agit-il d'une lente déshydratation de l'intérieur des axones, ou d'une lente pénétration des chaî-

nes de polymère dans les faibles espaces laissés libres entre les fibres ? Il paraît difficile de conclure. Nous avons vu qu'une modification de l'impédance de membrane peut être envisagée pour expliquer le ralentissement de conduction ; un ralentissement des échanges ioniques durant les phases d'augmentation de la conductance sodium serait plus séduisant. Il pourrait s'expliquer par l'existence contre la membrane excitable d'une couche orientée de polymère et d'eau, et l'extrusion des ions sodium de telles phases est envisageable d'après nos expériences *in vitro*. L'arrêt total de conduction n'est obtenu qu'avec PF-68 et PEG 6000 ; or ces polymères semblent se fixer plus volontiers sur la membrane (hématies) que PVP 11000. Leur effet pourrait ainsi être plus complet grâce à la réalisation d'un microenvironnement beaucoup plus strict sur la face membranaire externe.

Cependant, même après l'arrêt total de la conduction, la membrane n'est pas immobilisée dans un état suffisamment structuré pour être rendue insensible à la congélation-décongélation, puisque celle-ci détruit immédiatement et définitivement toute aptitude à la conduction d'influx.

Considérons maintenant les expériences *in vivo*, effectuées sur l'animal entier. Lors de l'étude de la cholérèse, les résultats obtenus sont de deux ordres : hémolyse *in vivo* et passage biliaire de l'eau.

En ce qui concerne l'hémolyse, les renseignements fournis ne sont pas très divers, mais ils ont cependant l'importance fondamentale d'être tout à fait parallèles à ceux donnés par les études sur les solutés hypotoniques *in vitro*, ce qui justifie les conclusions de ces dernières études.

En ce qui concerne le passage de l'eau dans la bile, au contraire, les courbes d'excrétion biliaire ouvrent de nouvelles perspectives. Elles confirment tout d'abord une différence assez fondamentale de comportement entre la PVP 11000 et les deux autres polymères. La PVP 11000 donne une hypercholérèse immédiate, relativement forte, proportionnelle à la dose. Une telle action évoque un mécanisme analogue à celui d'une cholérèse au déhydrocholate par exemple, c'est-à-dire suggère une élimination biliaire avec entraînement d'eau.

Nous pensons étudier avec plus de détail cet effet, car des résultats préliminaires, insuffisamment complets et précis pour pouvoir être rapportés ici, semblent indiquer que l'élimination biliaire du polymère, bien qu'elle existe, soit trop faible pour expliquer un simple entraînement "osmotique" d'eau avec la substance dissoute. On pourrait envisager un empêchement de la formation de micelles de sels biliaires, ce qui augmenterait leur nombre particulière et leur efficacité pour entraîner de l'eau. Des analyses plus complètes de la bile excrétée pourront seules faire avancer la question.

PEG 6000 et PF-68 donnent dans nos conditions d'expérience une phase d'hypochoolérèse suivie d'hypercholérèse plus que compensatrice, sans relation manifeste avec la dose. Dans nos conditions de perfusion, les concentrations sanguines sont du même ordre, puisque la perfusion de la dose double est faite deux fois plus lentement que celle de la faible dose ; dans les deux cas, les effets sont analogues. L'hypochoolérèse est sans doute un effet de nature osmotique. Notons cependant qu'elle traduit une interaction forte avec l'eau, car elle est obtenue même avec un soluté dont le Δ cryoscopique est fortement inférieur à l'isoomose avec le sérum sanguin (PF-68 à 10 p. 100 dans l'eau, $\Delta t \simeq -0,20^\circ \text{C}$). Lorsque CHENDEROVITCH (1963) obtenait une hypochoolérèse au mannitol ou au xylose, il utilisait des solutions à 1,66 M, soit environ 5,5 fois l'isoomose. Ici également il sera de toute première importance de disposer de dosages des polymères dans la bile. Leur passage n'est sans doute pas important car SHAFFER et CRITCHFIELD (1947) ont trouvé chez l'Homme que 96 p. 100 de la dose de PEG 6000 injectée était retrouvée dans l'urine dans les 12 premières heures, ce qui laisse peu de place à une élimination biliaire (voir : tableau II). Le PEG

1500, par contre, passe dans la bile (SPERBER, 1965), mais d'une façon plus faible que ne laisse supposer son pouvoir cholérétique. Pourtant, SHAFFER, CRITCHFIELD et NAIR (1950) indiquent que le PEG 400 ne passe pas dans la bile du Chien.

Tout, dans ces expériences, plaide en faveur d'interactions fortes des polymères avec l'eau extra-cellulaire, et il est vraisemblable que la poursuite de ces études devrait permettre d'acquérir quelques notions dans le domaine de la physiologie de la cholérèse, en utilisant les polymères comme de nouveaux outils expérimentaux, réactifs permettant d'aborder sous des angles neufs le problème du passage de l'eau dans l'hépatocyte et les voies biliaires. S'il peut être prouvé que ces corps transitent à travers l'hépatocyte, cette cellule pourrait servir de modèle expérimental pour aborder l'état de l'eau hyaloplasmique, car il y a des chances pour que le cytoplasme fondamental soit mis en cause au cours de la traversée. Des études infrastructurales seront aussi nécessaires pour rechercher si les lysosomes participent également au métabolisme, comme nous pensons l'avoir démontré au niveau du rein.

Il nous reste à considérer les hypothèses concernant les mécanismes de survenue des lésions du rein sensibilisé par une agression métabolique antérieure. Ces expériences sont sans doute les plus difficiles de toutes à interpréter, car elles mettent en jeu, en plus des différentes inconnues composant l'effet propre de chaque polymère, l'action d'un agent sensibilisant comme l'éthylène-glycol. Or, nous avons vu (chapitre VII) que l'effet propre de cette substance n'était pas lui-même connu avec certitude. Nous nous étions alors attaché à décrire les faits expérimentaux ; nous proposerons maintenant seulement des interprétations, sachant qu'elles ne sont que des hypothèses de travail, mais que de telles constructions, aussi fragiles qu'elles soient, sont indispensables pour stimuler le progrès des connaissances.

Nous supposerons donc que les polymères filtrent à travers le glomérule sans difficulté majeure, et sans produire de lésions caractéristiques à ce niveau. Puis, dans la lumière du tube proximal, les molécules chargées de leur enveloppe d'eau structurée se fixent au niveau des bordures en brosse en modifiant leur fonctionnement normal. Tant que cette zone est physiologiquement saine, les choses vont sans trop de mal : une petite quantité de polymères est absorbée par les vésicules de micro-pinocytose, puis elle entre dans le circuit des vacuoles et des lysosomes, où on la retrouve, à l'étude infrastructurale, dans certains corps denses. Comme la quantité absorbée reste petite, les vésicules formées gonflent un peu, mais la limite de résistance de leur membrane n'est pas atteinte, et peu à peu les corps résiduels contenant les polymères non métabolisables sont évacués par le processus des renouvellements cellulaires normaux. Même si quelques néphrons sont physiologiquement atteints, le nombre des néphrons de réserve est suffisant pour maintenir intact le pouvoir d'élimination fonctionnel normal de l'organe.

Le polymère restant dans la lumière passe l'anse de Henlé et atteint le tube distal et les collecteurs. A ce niveau, il est possible que les mouvements d'eau soient également quelque peu perturbés. Nous avons observé sur certains cli-chés une abondance particulière de vésicules de micropinocytose après administration des polymères seuls, mais nous n'avons pas pu l'interpréter car la littérature est fort avare de descriptions infrastructurales du tube distal et des collecteurs au cours des différents types de diurèse et d'antidiurèse.

Lorsque le tube rénal est déjà lésé par une agression comme celle que produit l'éthylène-glycol, la situation n'est plus la même. La rentrée des polymères dans la cellule devient en effet plus forte, soit parce que la perméabilité de la membrane est altérée par le glycol et que celle-ci laisse passer des molécules relativement grosses, soit que la micropinocytose se trouve activée par l'état patholo-

gique, soit que le polymère stagne davantage dans la lumière du fait d'un mauvais fonctionnement du système d'élimination ou d'une obstruction partielle des tubes par les cristaux d'oxalate, soit enfin que l'atteinte d'un certain nombre de néphrons entraîne pour ceux qui restent intacts une activité de réabsorption plus intense. Dans le tube proximal s'effectuent classiquement une réabsorption de sodium (échange contre H^+) et d'eau avec intervention de l'anhydrase carbonique, de glucose, phosphates, urée, potassium.

Une fois dans la cellule tubulaire, les polymères commencent à manifester une action nocive par leur hydrophilie exagérée. Ils sont d'abord concentrés par le système lysosomal, mais celui-ci est bientôt débordé car les polymères présents dans ces organites y appellent une quantité d'eau telle que leur membrane atteint bientôt sa limite de résistance et se fragmente, libérant dans le hyaloplasme son contenu dangereux d'enzymes hydrolytiques. Ces membranes sont d'ailleurs peut-être déjà fragilisées, comme le suggèrent certaines interprétations de l'action du glycol (DAVID et UERLINGS, 1964). Il serait sans doute intéressant de rechercher si des agents fragilisant les membranes lysosomales, comme la vitamine A (DINGLE et LUCY, 1965) ou les stabilisant, comme les corticoïdes (voir: WEISSMANN, 1968) auraient un effet sur l'évolution des lésions rénales par les polymères.

Parallèlement à l'entrée des polymères dans la cellule tubulaire, semble se manifester une incapacité cellulaire à les en faire sortir, soit par altération de la perméabilité de la membrane basale, soit par le fonctionnement défectueux du système lysosomes-vacuoles d'absorption (des aspects d'exocytose des lysosomes ont été décrits dans le rein : ALLISON, 1968).

Une fois le contenu enzymatique des lysosomes déversé dans le hyaloplasme, une véritable hydrolyse interne prend place. Les membranes de tous les organelles sont altérées, les polymères y entrent, entraînant de l'eau avec eux et provoquant un gonflement irréversible. L'altération de la membrane apicale par le même processus conduit à une entrée encore plus importante de polymères, et un cercle vicieux s'établit, qui rendra bientôt la cellule semblable à un sac sans structure dans lequel s'effectue une hydrolyse progressive de ses principaux constituants.

La concentration des molécules de polymères autour des membranes avec la création en ces sites d'une atmosphère d'eau liée particulière doit jouer un rôle important, car ce phénomène permet d'expliquer les différences de toxicité potentielle entre PEG 6000 et PF-68 d'une part, et PVP 11000 d'autre part, cette dernière, moins polarisée sur les membranes, ayant une toxicité beaucoup plus faible.

Ainsi, dans toutes nos expériences, bien que fort diverses, l'hypothèse d'une imbibition des molécules par une atmosphère d'eau structurée non solvante, associée à celle d'une concentration au niveau des structures membranaires, permet d'interpréter au moins en partie les phénomènes observés, sans que des arguments majeurs puissent y être opposés. Sans être prouvée, et sous réserve de vérifications expérimentales ultérieures, cette hypothèse est donc acceptable comme base unitaire d'interprétation des effets biologiques des molécules étudiées.

IV.— ROLE D'AUTRES FACTEURS DANS L'EFFET DES POLYMERES.

Diverses propriétés doivent être envisagées pour expliquer partiellement les effets constatés, en dehors des conceptions portant sur la fixation de l'eau. Nous évoquerons seulement rapidement l'action sur la tension superficielle, la balance hydrophile lipophile et la taille moléculaire.

La diminution de tension superficielle est souvent rendue responsable des actions des détergents. Par exemple, BLANPIN (1960), ROCHAT et Coll. (1967)

invoquent cette propriété pour l'action de surfactifs non ioniques sur les organes isolés ; HARDOUIN et AUBRION (1959) expliquent en partie ainsi l'action laxative de PF-68, etc... L'action tensio-active est associée à la notion de balance hydrophile lipophile (GRIFFIN, 1949), puisque les surfactifs possèdent dans leur molécule des sites d'affinité préférentielle pour l'eau et pour les graisses. A ce titre, seul le PF-68 peut réellement être catalogué comme détergent, puisqu'il est le seul à posséder des groupements lipophiles dans sa molécule; les deux autres molécules ne sont pas des surfactifs vrais, et les actions communes rencontrées pour les trois polymères ne peuvent donc pas être mises au compte de l'action détergente de la molécule. Les deux autres polymères ont cependant une action sur la tension superficielle, bien étudiée par COUPER et ELEY (1948) dans le cas des PEG. Pourtant la plupart de nos expériences sont conduites en solutions concentrées, au dessus de la concentration micellaire critique, et il semble que dans ces conditions, l'effet tensio-actif soit secondaire ; il deviendrait prépondérant aux faibles doses et c'est alors que l'on peut l'étudier de façon plus pure. Or à ces faibles concentrations, les polymères que nous étudions ne montrent guère d'effets décelables. Nous n'avons pas effectué de mesures de tension superficielle des solutions essayées, et cette étude fournirait sans doute des renseignements complémentaires utiles. Cependant, les arguments que nous venons de présenter semblent suffisants pour exclure un rôle primordial du facteur tension superficielle dans nos expériences. C'est dans les expériences d'oxalose expérimentale que ce facteur doit jouer le plus grand rôle en lésant les membranes.

La présence de groupements lipophiles semble en effet conférer une plus grande affinité pour les structures membranaires. C'est avec le PF-68 que nous avons observé les effets membranaires les plus nets, pouvant aller jusqu'à la fragilisation dans le cas de l'hémolyse en présence de saponine. Au cours de la résorption dans les vacuoles et les lysosomes du tube proximal du rein, une fragilisation des membranes de ces organelles doit sans doute également intervenir. La concentration dans les lysosomes, la plus nette avec le PF-68, est probablement en rapport avec le caractère détergent de cette molécule, puisque ces faits sont classiques au niveau du foie avec des surfactifs anioniques comme le Triton WR 1339. En outre, un autre agent tensio-actif de petit PM (1300 environ) le Tween 80, nous a donné dans les mêmes conditions quelques aspects de clarification au niveau du rein, lorsque la dose est suffisante et l'administration prolongée (DEBRAY et Coll., 1964).

Le rôle de la taille moléculaire ne peut pas être discuté complètement dans l'état actuel de nos expériences, car nous ne disposons pas d'expériences comparatives en nombre suffisant, effectuées avec des polymères de même nature et de PM variés.

Cependant, au niveau du rein, où les phénomènes de filtration sont importants, un certain nombre de constatations peuvent être faites. Pour obtenir des lésions glomérulaires, il faut employer des molécules très grosses. ROWLEY et Coll. (1962) avec la méthylcellulose, HALL et HALL (1962) avec l'alcool polyvinyle ont obtenu des lésions glomérulaires lorsque le PM est supérieur à 1000.000 ; un alcool polyvinyle de PM 38.000 ne donnait pas de lésions dans le travail de ces auteurs.

Dans le cas du Dextran, c'est avec la fraction de PM 40.000 que des accidents tubulaires ont été rapportés chez l'Homme (GIROMINI, 1967, FILLASTRE, 1967, AUQUIER, 1968, etc...) plus qu'avec les fractions de PM 75.000. Dans nos expériences avec le Dextran 75.000 chez le Rat, nous avons observé une atteinte interstitielle, mais pas d'aspects de clarification tubulaire : la résorption de ce polymère par les cellules tubulaires semble donc moins facile que pour les molé-

cules plus petites ; au contraire, la rate se charge de macrophages à cytoplasme spumeux et c'est donc le système réticulo histiocytaire qui prend plus volontiers en charge les molécules de cette taille. Lorsque des polymères de petit PM (5000 à 10.000) sont injectés, la rate est habituellement normale, alors que certaines cellules hépatiques résorbent un peu de polymère (PF-68) et surtout que les cellules tubulaires s'en chargent fortement. La PVP est dans nos expériences le polymère le mieux toléré, puisque nous n'avons pratiquement pas trouvé de lésions avec la fraction PM 40.000 ni avec la fraction PM 10.000. La plus faible action membranaire de ce polymère est sans doute à rapprocher de cette bonne tolérance in vivo.

RESUME ET CONCLUSIONS

Cette étude tente d'individualiser une action physicochimique susceptible d'interférer dans les processus biologiques en général : la fixation de l'eau sur des molécules hydrophiles exogènes non métabolisables. Cet essai est considéré comme une voie d'abord pouvant mener dans l'avenir à une meilleure compréhension des relations entre l'eau et les molécules hydrophiles que sont les protéines, et par là-même, à une meilleure connaissance des états de l'eau dans les systèmes intra-cellulaires que leur concentration amène au seuil du gel, comme la phase continue soluble du hyaloplasme.

Nous avons choisi des polymères de synthèse, relativement faciles à obtenir, chimiquement définis, et peu ou pas métabolisables afin de ne pas avoir à considérer cette variable supplémentaire. L'étude de ces substances a été poursuivie en se fondant sur un principe de diversité à deux directions, retenu pour tenter de mettre en lumière le phénomène de fixation d'eau. Dans une première direction nous avons choisi des polymères variés ; dans une autre, nous avons étudié des structures biologiques fort diverses. Diversité n'est pas dispersion. En effet, le but ainsi recherché est d'établir une sorte de série d'équations à plusieurs inconnues, dans laquelle l'action totale de chaque polymère est la somme d'une série d'actions partielles ; la résolution de ce système semi-quantitatif devrait permettre d'isoler une des actions partielles : la fixation de l'eau, des autres effets, considérés ici comme des phénomènes contingents.

Les polymères retenus ont été choisis d'après leur faible toxicité, leur poids moléculaire (de l'ordre de 5000 à 10000), leur hydrophilie, la présence de groupements polaires aptes à former des liaisons avec l'eau, la présence éventuelle de groupements lipophiles. Nous avons employé : un polyoxyéthylène glycol (PEG 6000), un polymère mixte de l'oxyde d'éthylène et de propylène (PF-68) et une polyvinylpyrrolidone (PVP 11000).

Après avoir esquissé et motivé les principales techniques utilisées, nous résumons d'abord, d'après la littérature, les propriétés physico-chimiques et biologiques essentielles des molécules retenues. Sans constituer une étude exhaustive de ces corps, ces données permettent de se faire une idée assez précise de leurs principales caractéristiques. Divers contrôles physico-chimiques appliqués aux échantillons utilisés sont ensuite exposés.

Dans un ordre de complexification croissante, nous donnons les résultats de notre expérimentation en partant des études *in vitro* sur des systèmes non vivants, pour aboutir aux études portant sur l'animal entier.

La formation de gels *in vitro*, en présence de sels minéraux, est d'abord considérée. Des différences apparaissent en fonction de la nature du polymère et de celle du sel minéral employé, donnant une gélification totale ou des systèmes biphasi-

ques liquide-liquide ou liquide-gel. L'influence de la température est étudiée entre 4 et 37° C, ainsi que celle des concentrations respectives de polymère et de sels, permettant d'établir des diagrammes d'état indiquant les zones favorables à la gélification.

Nous rapportons ensuite des expériences visant à mettre en évidence une interaction des polymères avec l'ion sodium in vitro, en mesurant sa concentration apparente par une méthode électrochimique employant une électrode à pNa. La dénaturation des protéines solubles extra-cellulaires et la modification de certaines actions enzymatiques en présence de polymères sont aussi envisagées.

L'action sur les échanges d'eau à travers la membrane cellulaire a été recherchée sur les hématies, matériel qui permet d'aborder les modifications de perméabilité et certains effets directs de fixation membranaire.

Plusieurs techniques complémentaires sont employées : mesure de l'hémolyse en solutions hypotoniques mixtes de chlorure de sodium et de polymères, avec comparaison aux mesures d'abaisséments cryométriques des solutions en expériences, mesure du volume cellulaire dans les mêmes milieux, étude de l'hémolyse par des agents lésant directement la membrane : saponine et lysocithine, tentatives de protection contre les lésions de congélation-décongélation, recherche d'une interaction avec certaines zones de la membrane, comme les récepteurs mucoprotéiques fixant les myxovirus. Les résultats de ces expériences sont discutés en fonction des résultats de la littérature, concernant l'action de divers surfactifs et polymères sur l'hémolyse, l'état de charge des hématies et les modifications de leur surface.

Les phénomènes de contractilité et d'excitabilité sont ensuite étudiés sur le muscle lisse intestinal et le nerf périphérique. Une inhibition des mouvements musculaires et de la conduction nerveuse est décrite et discutée en fonction des résultats d'autres auteurs et en particulier en considérant les hypothèses sur les états d'hydratation des protéines de structure des membranes excitables. La comparaison avec une série d'autres agents bloquant la conduction nerveuse permet d'évoquer successivement diverses possibilités pour les mécanismes mis en jeu, le plus vraisemblable restant finalement un effet physicochimique de fixation d'eau, pouvant lui-même agir par l'intermédiaire de modifications de l'équilibre ionique, analogue par certains aspects à l'effet de l'hypertonie ionique.

Nous abordons ensuite sur l'animal entier un aspect différent des phénomènes de perméabilité : le passage de l'eau à travers l'hépatocyte et la formation de la bile, qui permet simultanément par l'examen de l'élimination de bilirubine, de confirmer in vivo les notions sur l'hémolyse obtenues précédemment in vitro.

Nous décrivons d'abord les techniques personnelles mises au point tant pour le recueil de la sécrétion biliaire chez le Rat que pour le dosage de la bilirubine. Après avoir exposé les résultats, et en particulier les phases d'hypocholestérémie, la discussion des effets observés est menée en fonction des données actuelles sur les mécanismes de la sécrétion biliaire, qui sont brièvement résumés à ce propos.

Le dernier chapitre expérimental est consacré à l'étude des phénomènes de toxicité potentielle des polymères, observés au niveau du rein lors de la sensibilisation des animaux par une néphrite à l'éthylène-glycol. A ce propos nous décrivons en détail l'outil expérimental que représente ici l'oxalose rénale du Rat et nous discutons de son mécanisme et des aspects de sa reproductibilité technique, grâce à notre expérience assez longue de la méthode. Celle-ci, portant sur environ huit ans, nous permet d'interpréter les résultats de ces expériences. En se basant sur des données statistiques recueillies pendant cette période, le rôle de divers facteurs est discuté (dose d'éthylène glycol, âge, sexe, calcium et agents complexants).

Les lésions obtenues par les polymères sont décrites du point de vue biologique et morphologique, en microscopie photonique et électronique. Avant d'interpréter les données infra-structurales, nous donnons un bref rappel de la structure histologique du rein, en insistant sur le tubule contourné proximal, zone la plus touchée par les modifications cytologiques dues aux polymères. A ce propos sont évoquées les conditions de fixation et la structure des corpuscules cytoplasmiques et de leurs inclusions. La spécificité des altérations cellulaires est discutée ainsi que la participation de diverses organelles dans leur apparition. La comparaison avec d'autres polymères, aussi bien d'après nos expériences personnelles que d'après la littérature, permet d'évoquer un mécanisme dans lequel l'imbibition des chaînes de polymères par l'eau cellulaire joue un rôle de premier plan.

Enfin, dans une discussion générale, toutes nos expériences sont reprises et analysées en fonction des hypothèses concernant la structure de l'eau liquide, qui sont rapidement résumées à cette occasion. Cette analyse amène à considérer que des phénomènes de destruction et de restructuration des édifices moléculaires de l'eau liquide pourraient fort bien être invoqués pour expliquer la quasi-totalité des effets constatés.

En conclusion, ce travail permet d'établir les principaux points suivants :

- In vitro, en solutions concentrées, le pluronic F-68 forme des gels en présence de certains sels minéraux, spécialement les chlorures alcalins. Les trois polymères (PEG 6000, PF-68, PVP 11000) donnent des systèmes biphasiques avec de nombreux autres sels, à la suite de phénomènes de relargage.
- In vitro, les trois polymères modifient la concentration apparente de l'ion sodium, mesurée avec une électrode à pNa. Dans nos conditions, il est observé une augmentation de pNa en présence des polymères ; il est suggéré que selon les conditions de temps, de concentration, de température et d'environnement, il puisse y avoir soit extrusion, soit fixation des ions minéraux dans l'atmosphère d'eau liée au polymère.
- Les polymères n'ont pas d'action hémolytique propre in vitro, ni in vivo ; en présence de chlorure de sodium, ils protègent partiellement les hématies contre l'hémolyse osmotique, davantage que ne le laissent supposer leur poids moléculaire et l'abaissement cyrométrique de leurs solutions. L'intensité de l'effet est variable dans l'ordre suivant : PF-68 > PEG 6000 > PVP 11000.
- Des mesures comparatives de volume et de résistance globulaire indiquent un effet apparent de consolidation membranaire en milieux chlorurés sodiques hypotoniques pour PF-68 et PEG 6000, qui n'est pas trouvé avec la PVP 11000.
- L'étude d'agents hémolytiques à action membranaire directe conduit à des résultats un peu différents : protection légère contre l'hémolyse par saponine pour PEG et PVP, contre l'hémolyse par lysocithine pour PEG et PF-68, sensibilisation légère à l'hémolyse par saponine avec PF-68.
- Les trois polymères dépriment puis suppriment la motricité spontanée du muscle lisse intestinal in vitro. Le PF-68 semble plus toxique que les autres polymères sur cette préparation. Les contractions provoquées par l'acétylcholine et le baryum sont inhibées par les trois polymères, avec des différences quantitatives d'action. C'est le phénomène musculaire contractile lui-même qui semble influencé, de façon réversible.
- La conduction de l'influx dans le nerf de Grenouille isolé est ralentie par les trois polymères, puis supprimée à doses fortes par PF-68 et PEG 6000, et non par PVP 11000. Ces effets sont réversibles par lavage.
- In vivo, PEG 6000 et PF-68 montrent une action biphasique sur le débit biliaire : hypocholérèse suivie d'hypercholérèse. La PVP 11000 donne un seul effet, cholérétique immédiat. L'excrétion supplémentaire de bile semble reliée à la dose injectée pour PVP 11000, et à la concentration sanguine pour PF-68 et PEG 6000.

- In vivo, chez des Rats sensibilisés par une néphrite tubulaire à l'éthylène-glycol, on observe une forte aggravation des altérations rénales fonctionnelles et histologiques avec PF-68 et PEG 6000, et pas d'action avec PVP 110000 aux mêmes doses. L'analyse infrastructurale des lésions, dont l'aspect photonique est celui de "néphrose osmotique", indique une participation des lysosomes et des vacuoles d'absorption du tubule proximal. Les images photoniques sont très comparables aux aspects rapportés chez l'Homme au cours d'accidents provoqués par certains succédanés du plasma.
- Ces actions variées semblent pouvoir être expliquées par un mode d'action unitaire principal : fixation d'eau sur les chaînes de polymères, entraînant une immobilisation d'eau solvante supérieure aux prévisions faites par les lois s'appliquant aux solutions diluées de non électrolytes. Cette action principale est plus ou moins modulée selon les circonstances et suivant les polymères par des effets secondaires : action sur les membranes et action détergente en particulier.

Annexe :

ABREVIATIONS ET SYMBOLES UTILISES DANS LE TEXTE ET LES TABLEAUX

a) Notations statistiques

Les symboles choisis pour caractériser les principales variables sont les suivants :

X ou Y	valeurs individuelles des mesures,
$\bar{X}$ ou $\bar{Y}$, ou M	moyenne arithmétique,
n	nombre de mesures,
x ou y	écart à la moyenne d'une valeur individuelle de X ou Y ,
S	somme de ; le plus souvent :
	SX ou SY somme des valeurs individuelles
	SX^2 ou SY^2 somme des carrés des valeurs individuelles,
	Sx^2 ou Sy^2 somme des carrés des écarts à la moyenne
	$(Sx^2 = SX^2 - \frac{(SX)^2}{n})$,
T.C.	terme de correction
	$(= \frac{(SX)^2}{n})$
s^2	variance
	$(= \frac{Sx^2}{n-1})$
s_m^2	variance d'une moyenne
	$(= \frac{s^2}{n})$
s_d^2	variance d'une différence de deux moyennes,
s	écart-type $(= \sqrt{s^2})$
s_m	erreur-type d'une moyenne $(= \sqrt{s_m^2} = \frac{s}{\sqrt{n}})$,
s_d	écart-type d'une différence de deux moyennes $(= \sqrt{s_d^2})$,
Cv	Coefficient de variation $(= \frac{s}{M} \times 100)$

La plupart de ces notations sont empruntées à l'excellent ouvrage de LISON (1958), où l'on trouvera la description détaillée de presque toutes les méthodes employées.

La comparaison de deux moyennes a été effectuée soit par le test t de STUDENT-FISHER, soit par analyse de variance et test F de SNEDECOR, qui sont équivalents dans le cas de deux moyennes seulement ($t = \sqrt{F}$).

Lorsque plus de deux moyennes sont à comparer, nous avons utilisé l'analyse de variance, suivant un plan factoriel ou non, avec des tests F, éventuellement complétée par l'étude de la régression linéaire. Lorsque les régressions sont calculées, il vient les notations suivantes :

SXY	somme des produits des valeurs individuelles correspondantes de X et de Y,
Sxy	somme des produits des écarts des valeurs individuelles de X sur leur moyenne par les écarts des valeurs correspondantes de Y sur leur moyenne,
b	coefficient de régression ($b = \frac{Sxy}{Sx^2}$)
a	terme constant de l'équation de la droite de régression ($a = \bar{Y} - b\bar{X}$),
s_b^2	variance de b,
s_b	écart-type de b.

Les seuils de confiance sont indiqués dans les tableaux et dans le texte par la lettre P, suivi du niveau de probabilité correspondant (0,05 à 0,001).

NS = non significatif

b) Notation par différence à une valeur de départ.

Lorsqu'une grandeur est suivie au cours du temps, à partir d'un certain point zéro défini expérimentalement, nous utilisons volontiers la notation Δ , suivie d'un chiffre indiquant le temps. Par exemple, lors des études de cholérèse, Δ_{30} Débit Bilirubine signifie : différence entre le débit de bilirubine mesuré pendant 30 minutes après le temps zéro et pendant 30 minutes avant. Pour une expérience donnée, le découpage de l'échelle des temps est fait en fractions de longueur donnée : 30 minutes par exemple. L'indice placé après la notation Δ indique qu'il s'agit de la fraction de temps se terminant avec la valeur de cet indice, la différence se faisant toujours à la valeur de départ. Exemple : Δ_{180} Débit différence du débit de la 150^e à la 180^e minute, au débit pendant les 30 minutes précédant le temps zéro (- 30 à 0).

Ces valeurs ne correspondent pas à des mesures instantanées, qui sont généralement impossibles, mais à des résultats intégrés pendant un certain intervalle de temps (30 minutes dans les exemples choisis).

Dans certaines expériences, les valeurs de Δ présentées correspondent à des intervalles de temps variés pendant l'expérience. Dans ces cas, pour une mesure donnée, les différences sont faites sur un même intervalle de temps, au moment de la mesure et juste avant le temps zéro. Les chiffres sont ensuite éventuellement ramenés en unités cohérentes.

BIBLIOGRAPHIE

ALBERTSSON P.A. -

1960 : Partition of cell particles and macromolecules.
Almqvist et Wikseel, Stockholm, 1 vol., 231 p.

ALBERTSSON P.A. -

1962 : Partition methods for fractionation of cell particles and macromolecules.
Meth. of Biochem. An., 10, 229-262.

ALBERTSSON P.A. et BAIRD G.D. -

1962 : Counter-current distribution of cells.
Exp. Cell. Res., 28, 296-322.

ALLISON A.C. -

1968 : Effects of drugs and toxic agents on lysosomes -
In : The interaction of drugs and subcellular components in animal cells.
J. et A. CHURCHILL, London, 1 vol., 218-355.

ALTMAN J., WAKIM K.G. et WINKELMANN R.K. -

1962 : Effects of edathamil disodium on the kidney.
J. Invest. Derm., 38, 215-218.

ANDERSON N.G. -

1956 : Studies on isolated cell components - IX. The soluble phase.
Exp. Cell. Res., 11, 186-196.

ANDERSON N.G. -

1959 : Studies on isolated cell components - X. Structure formation by clear liver protein solutions.
Exp. Cell. Res., 16, 42-48.

ANDERSON N.G., MAKINODAN T. et NORRIS C.B. -

1961 : Studies on isolated cell components. XIII. The effect of heat on rat liver soluble proteins.

Exp. Cell. Res., 22, 526-534.

AUQUIER L., PAOLAGGI J.B., ROUQUES Cl. et DASTUGUE B. -

1968 : Anurie mortelle après perfusions de Dextran de bas poids moléculaire.

Thérapie, 23, 751-754.

BABAYAN V.K., KAUNITZ H. et SLANETZ C.A. -

1964 : Nutritional studies of polyglycerol esters.

J. Am. Oil Chem. Soc., 41, 434-437.

BADIN J. -

1965 : La réaction de Burstein : son intérêt clinique, biochimique et physiopathologique.

Presse Méd., 73, 2659-2663.

BANGHAM A.D. et HORNE R.W. -

1964 : Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface active agents as observed in the electron microscope.

J. Mol. Biol., 8, 660-668.

BARAJAS L. et LATTA H. -

1965 : The development of the juxtaglomerular cell granule.

Anat. Record, 151, 321.

BARUFFINI A. -

1959 : L'impiego degli agenti tensio attivi nelle preparazione iniettabili.

Farmaco, Ed. Prat., 14, 496-501.

BASTIDE J., BASTIDE P., MALET P., TURCHINI J.P. et DASTUGUE G. -

1966 : Activité adénosine triphosphatasique dans les reins de Rat et de Souris au cours de l'intoxication expérimentale au nitrate d'uranyle (Etude biochimique et histochimique).

Thérapie, 21, 1607-1616.

BATTIFORA H., EISENSTEIN R., LAING G.H. et MAC CREARY P.

1966 : The kidney in experimental magnesium deprivation.

Am. J. Path., 48, 421-437.

BAUDHUIN P., BEAUFAY H. et DE DUVE C. -

1965 : Combined biochemical and morphological study of particulate fractions from rat liver.

J. Cell. Biol., 26, 219-243.

BELLO J., BELLO H.R. et VINOGRAD J.R. -

1962 : Functional groups in the gelation of gelatin.

Biochim. Biophys. Acta, 57, 222-229.

BELLO J., BELLO H.R. et VINOGRAD J.R. -

1962 : Mechanism of the gelation of gelatin. Influence of pH, concentration and electrolytes.

Biochim. Biophys. Acta, 57, 214-221.

BENEZECH C. -

1958 : Physico-chimie biologique et médicale.

Masson, 1 vol., 684 p.

BENEZECH C. -

1962 : L'eau, base structurale et fonctionnelle des êtres vivants.

Masson, 1 vol., 175 p.

BENNETT A.L. et CHINBURG K.G. -

1946 : The effects of several local anesthetics on the resting potential of the isolated frog nerve.

J. Pharm. Expl. Ther., 88, 72-81.

BERENDSEN H.J.C. et MIGCHELSEN C. -

1965 : Hydration structures of fibrous macromolecules.

Ann. N.Y. Ac. Sci., 125, 365-379.

BERNHARD R. -

1968 : What's new with cytoplasmic organelles ?

Sci. Res., 3, n° 16, 26-27.

BESANCON F., ROZE C., SOUCHARD Mlle M., BARBIER P. et DEBRAY Ch. -

1967 : La fonction biliaire au cours d'expériences de cholestase extra-hépatique incomplète.

Rev. Int. Hépat., 17, 537-553.

BESSE J.H. -

1951a: Contribution à l'étude expérimentale du métabolisme de la polyvinylpyrrolidone - Action des injections intraveineuses répétées de solutions concentrées de polyvinylpyrrolidone chez le Lapin.

Thérapie, 6, 54-64.

BESSE J.H. -

1951b: Recherches expérimentales sur le métabolisme de la polyvinylpyrrolidone - Etude de l'élimination urinaire, de la concentration sanguine et tissulaire après essais de blocage expérimental du système réticulo-endothélial.

Thérapie, 6, 381-388.

BIZARD G. -

1958 : Formation de la bile et mécanismes d'action des cholérétiques.

Thérapie, 13, I - XV.

BIZARD G., VANLERENBERGHE J., ROBELET A., MILBLED G. et GUERRIN F. -

1957 : Sécrétion de bile par le foie de Rat en perfusion.
I. Action du CNK.

J. Physiol., Paris, 49, 49-53.

BIZARD G., VANLERENBERGHE J., GUERRIN F., ROBELET A. et MILBLED G. -

1957 : Sécrétion de la bile par le foie de Rat.
II. Action du fluorure de sodium.

C.R. Soc. Biol., 151, 1889-95.

BIZARD G., VANLERENBERGHE J., ROBELET A., MILBLED G. et GUERRIN F. -

1958 : Sécrétion de la bile par le foie de Rat.
III. Action de l'acétazolamide.

Thérapie, 13, 1006-1025.

BIZARD G., VANLERENBERGHE J., GUERRIN F. et GODCHAUX R.

1958 : Rôle de l'anhydrase carbonique dans la formation de la bile.

J. Physiol., Paris, 50, 155-156.

BIZARD G., VANLERENBERGHE J., GUERRIN F., ROBELET A. et MILBLED G. -

1958 : Sécrétion de bile par le foie de Rat.

IV. Action de la meralluride.

J. Physiol., Paris, 50, 157-159.

BLANK H. et MAC CARTHY P.L. -

1950 : A general method for preparing histologic sections with a water soluble wax.

J. Lab. Clin. Med., 36, 776-781.

BLANPIN O. -

1958 : Modifications de l'intensité d'action pharmacodynamique par les substances dites mouillantes.

Prod. Pharm., 9, 425-427.

BLANPIN O. -

1960 : Influence des surfactifs sur l'activité de l'histamine et et l'acétylcholine.

Thérapie, 15, 61-72.

BLANPIN O., BARBIER et MAYNIER M. -

1960 : Etude pharmacologique d'un surfactif non ionique.

Ann. Ph. Fr., 18, 53-66.

BLOOM W. et FAWCETT D.W. -

1968 : A textbook of histology.

W.B.S. SAUNDERS, Philadelphie, London, 9° Ed.,
1 vol., 858 p.

BODIN J.T. et TAUB A. -

1955 : Polyethyleneglycol 400 as a stabilizing solvent in parenteral pentobarbital sodium solutions.

J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed., 44, 296.

BOLIS L. et PETHICA B.A. -

1968 : Membrane models and the formation of biological membranes.

North Holland Publ. Cy., Amsterdam, 1 vol., 337 p.

BONACCORSI A. et WEST G.B. -

1963 : Absence of capillary permeability response to Dextran and albumine in the Rat.

J. Pharm. Pharmacol., 15, 372-378.

BOQUET P., IZARD Y., MEAUME J. et JOUANNET M. -

1967 : Recherches biochimiques et immunologiques sur le venin des serpents.

IV. Etude des propriétés enzymatiques et toxiques des fractions obtenues par filtration du venin de *Naja Nigricollis* sur Sephadex.

Ann. Inst. Pasteur, 112, 213-235.

BORGSTROM B., DAHLQVIST A., LUNDH G. et SJOVALL J. -

1957 : Studies of intestinal digestion and absorption in the human.

J. Clin. Invest., 36, 1521-1536.

BOURRILLON R. et STOLIAROFF M. -

1953 : Sort du dextran injecté dans l'organisme.

C.R. Soc. Biol., 147, 241.

BRAUN K. -

1966 : The effects of intracardiac and intravenous injections of hypertonic saline on pulmonary venous and systemic arterial pressures.

Arch. Int. Pharmacodyn., 160, 99-105.

BREÏTBURD P. , PUISIEUX F. et LE HIR A. -

1966 : Identification des polyoxyéthyléneglycols par chromatographie sur couches minces.

Ann. Pharm. Fr., 24, 191.

BRICKA M. et BESSIS M. -

1955 : Sur la conservation des érythrocytes par congélation à basse température en présence de polyvinylpyrrolidone et de dextran.

C.R. Soc. Biol., 149, 875-877.

BULLOCK T.H., GRUNFEST H., NACHMANSOHN D. et ROTHENBERG M.A. -

Generality of the role of acetylcholine in nerve and muscle conduction.

J. Neurophysiol., 10, 11-21.

BUNKER J.P. et VANDAM L.D. -

1965 : Effects of anesthesia on metabolism and cellular functions.

Pharmacol. Rev., 17, 183-263.

CAHEN R. et AUBRON S. -

1959 : Etude d'un polyoxyéthylène oxypropylène.
1° Etude pharmacologique.
Thérapie, 14, 712-720.

CAHEN R. et CHARLOT J. -

1959 : Etude d'un polyoxyéthylène oxypropylène.
2° Etude toxicologique.
Thérapie, 14, 721-730.

CALCAGNO L. -

1962 : Lecito l'impiego indiscriminato dei tensio attivi nei
medicamenti.
Minerva Farm., 11, 181-182.

CAMPBELL P.N. -

1968 : The interaction of drugs and subcellular components
in animal cells.
J. et A. CHURCHILL, Ed., London, 1 vol., 355 p.

CARLINI E.A. -

1964 : Hypotensive effect of intravenous injections of hyper-
tonic solutions in the Rat.
Arch. Int. Pharmacodyn., 151, 1-12.

CARPENTER C.P. et SHAFFER C.B. -

1952 : A study of the polyethylene glycols as vehicles for intra-
muscular and subcutaneous injection.
J. Am. Pharm. Ass., Sci. Ed., 41, 27-29.

CASTANEDA A.R., BERNSTEIN E.F. et VARCO R.L. -

1965 : The effect of polyvinylpyrrolidone, mannitol, dextrose
and of various Dextrans on red blood cell charge.
Bibl. Anat., 7, 262-266.

CAULET T., ADNET J.J. et HOPFNER C. -

1968 : Thésaurisme d'origine médicamenteuse. A propos de
cinq observations.
Thérapie, 23, 1049-1059.

CHAKRAVARTY D.C. et LACH J.L. -

1959 : Interaction between high molecular weight polyethylene-
glycols and some pharmaceuticals.
Drug Standards, 27, 6-9.

CHAN P.C., CALABRESE V. et THEIL L.S. -

1964 : Species differences between the effect of sodium and potassium ions on the ATPase of erythrocytes membranes.

Biochim. Biophys. Acta, 79, 424-426.

CHANG C.Y. et SIMON E. -

1968 : The effect of dimethylsulfoxyde on cellular systems.

Proc. Soc. Expl. Biol. Med., 128, 60-66.

CHARIOT J., ROZE C. et Melle SOUCHARD M. -

1966 : Dosage simultané des protides totaux et de l'amylase sur des microéchantillons de suc pancréatique de Rat.

Technicon Symposia, vol. II, p. 383-388.

CHARIOT J. et ROZE C. -

1968 : Technique automatique de dosage de la bilirubine dans la bile par la méthode de Jendrassik.

Ann. Biol. Clin., 26, 127-132.

CHARNICKI W.F.

1958 : Surfactive agents in parenterals.

Am. J. Pharm., 130, 409-418.

CHENDEROVITCH J. -

1963 : Les conceptions actuelles des mécanismes de la sécrétion biliaire.

Presse Méd., 71, 2645-2648.

CHENDEROVITCH J. -

1966 : Le rôle des voies biliaires dans les mécanismes de la cholérèse.

Rev. Mal. Foie, 41, 155-166.

CHENDEROVITCH J. -

1968 : Stop flow analysis of bile secretion.

Am. J. Physiol., 214, 86-90.

CHENDEROVITCH J., PHOCAS E. et RATUREAU M. -

1963 : Effects of hypertonic solutions on bile formation.

Amer. J. Physiol., 205, 863-867.

CHENDEROVITCH J., PHOCAS E., TROUPEL S., RENAULT H.
et CAROLI J. -

1961 : Le transfert des grosses molécules du sang dans la bile et la lymphe hépatique chez le Cobaye.

Rev. Fr. Et. Clin. Biol., 6, 470-472.

CHEVELIER A., CHAMBRON J. et MANUEL S. -

1961 : Influence de la présence de polyvinylpyrrolidone sur la cancérisation expérimentale par le 3-4 benzopyrène.

C.R. Soc. Biol., 4, 895.

CHIRAY M., JUSTIN-BESANCON L., DIERYCK J. et DEBRAY C. -

1938 : Les lésions rénales de l'oxalémie expérimentale.

Congrès d'Evian : L'insuffisance rénale. Masson, 167-192.

COOPER H., LEVITAN R., FORDTRAN J.S. et INGELFINGER F.J.

1966 : A method for studying absorption of water and solute from the human small intestine.

Gastroenterology, 50, 1-7.

COOPER A. et ELEY D.D. -

1948 : Surface tension of polyoxyethyleneglycol solutions.

J. Polymer. Sci., 3, 345-349.

COUTURIER D. -

1968 : Electrophysiologie du muscle lisse intestinal. Etude expérimentale du colon in situ.

Thèse Doct. Méd., Paris, Copédith, 1 vol., 61 p.

COUTURIER D., ROZE C., COUTURIER-TURPIN M.H. et DEBRAY C. -

1969 : Electrical slow waves in the distal colon in situ. An experimental study in man and the rabbit.

Gastroenterology, 56.

CROMMER J. -

1956 : The pathogenesis of R.E. foam cells ; effect of PVP on the liver of the mouse.

Amer. J. Path., 32, 433-453.

DALTON A.J. et HAGUENAU F. -

1967 : Ultrastructure of the Kidney.

Academic Press, N.Y. et London, 1 vol., 240 p.

DAVID M. et UERLINGS I. -

1964 : Die wirkung der Äthylenglykolvergiftung auf das submikroskopische Bild der Rattenniere.

Acta Biol. Med. German, 12, 203-218.

DAVIES J. -

1954 : Cytologic evidence of protein absorption in fetal and adult mammalian Kidneys.

Am. J. Anat., 94, 45-71.

DAVIES J.W.L., RICKETTS C.R. et WILLIAMS B.N. -

1963 : Expansion of plasma volume by rapid infusion of low molecular weight Dextran.

Brit. J. Pharmacol., 21, 220-225.

DAVIS H.L., DAVIS N.L. et CLEMONS A.L. -

1967 : Procoagulant and nerve blocking effects of D.M.S.O.

Ann. N.Y. Ac. Sci., 141, 310-325.

DEBRAY C., DE LA TOUR J., VAILLE C., ROZE C. et Melle SOUCHARD M. -

1962 : Contribution à l'étude de la sécrétion biliaire et pancréatique externe chez le Rat.

J. Physiol. Paris, 54, 459-499.

DEBRAY C., MEHAUT M. et THUAU F. -

1952 : Etude de quelques "agents mouillants" ; leur utilisation en gastro-entérologie.

Sem. Hôp. Paris, 28, 371-377.

DEBRAY C., VAILLE C., MARTIN E., Melle SOUCHARD M. et ROZE C. -

1963a : Etude anatomopathologique de la lithiase rénale à l'éthylène-glycol du Rat.

Sem. Hôp. Paris, 39, 101-110.

DEBRAY C., VAILLE C., MARTIN E., Melle SOUCHARD M. et ROZE C. -

1963b : Les maladies expérimentales par "sommation". Action de hauts polymères sur l'intoxication par l'éthylène-glycol du Rat.

Sem. Hôp. Paris, 39, 110-117.

DEBRAY C., VAILLE C., FIEHRER A., MARTIN E., Melle SOUCHARD M. et ROZE C. -

1964 : Les maladies expérimentales par agressions couplées. Perturbations humorales et viscérales provoquées par le Tween 80 chez les rats atteints de néphrite oxalique expérimentale à l'éthylène-glycol.

J. Physiol., Paris, 56, 707-726.

DEBRAY C., VAILLE C., Melle SOUCHARD M. et ROZE C. -

1967a : Contribution à l'étude des phénomènes d'hémolyse chez le Rat.

I. Comportement des érythrocytes in vitro.

J. Physiol., Paris, 59, 445-472.

DEBRAY C., VAILLE C., Melle SOUCHARD M. et ROZE C. -

1967b : Contribution à l'étude des phénomènes d'hémolyse chez le Rat.

II. Hypotonie et élimination de la bilirubine biliaire.

J. Physiol., Paris, 59, 473-487.

DEBRAY C., VAILLE C., MARTIN E., Melle SOUCHARD M. et ROZE C. -

1968 : L'intoxication par l'éthylène-glycol. Un contre-poison: l'ion citrate.

Sem. Hôp. Paris, 44, 3001-3009.

DE DUVE C. et BAUDHUIN P. -

1966 : Peroxisomes (microbodies and related particles).

Physiol. Rev., 46, 323-357.

DE DUVE C. et WATTIAUX R. -

1966 : Functions of lysosomes.

Annual Rev. of Physiol., 28, 435-492.

DELBARRE F., PAOLAGGI J.B. et BASSET F. -

1964 : Thésaurismose artificielle par polyvinylpyrrolidone. Présentation de deux cas.

Soc. Méd. Hôp. Paris, 115, 243-258.

DELMOTTE A. et EDMOND M. -

1960 : Propriétés bactéricides des détersifs cationiques.

Thérapie, 15, 125-133.

DEMING A.B. et LUETSCHER J.A. -

1950 : Bioassay of Doca like material in urine.

Proc. Soc. Expl. Biol. Med., 73, 171-175.

DEWEY M.H. et BARR L. -

1962 : Intercellular connection between smooth muscle cells : the nexus.

Science, 137, 670-672.

DI MATTEI P. -

1960 : Les pharmacothésaurismoses.

Actual. Pharmacol., 13, 189-236.

DINGLE J.T. et LUCY J.A. -

1965 : Membrane phenomenons in relation to vitamin A.

Proc. Nutrit. Soc., 24, 170-172.

DROST-HANSEN W. -

1965 : The effects on biologic systems of higherorder phase transitions in water.

Ann. N.Y. Ac. Sci., 125, 471-501.

EICKHOLT T.H. et WHITE W.F. -

1960 : The toxicity and absorption enhancing ability of surfactants.

Drug Stand., 28, 154-162.

ELIASSON R. et SAMELIUS-BROBERG U. -

1963 : Effect of some Dextran fractions on the stability of blood suspensions after intravenous injection in the cat.

Acta Physiol. Scand., 58, 211-215.

ERICSSON J.L.E. -

1964 : Absorption and decomposition of homologous hemoglobin in renal proximal tubular cells.

Acta Pathol. Microbiol. Scand., Suppl. 168, 1-121.

ERICSSON J.L.E. et TRUMP B.F. -

1964 : Electron microscopic studies of the epithelium of the proximal tubule of the Rat kidney.

I. The intracellular localisation of acid phosphatase.

Lab. Invest., 13, 1427-1456.

EVANS R.A., FORBES H.A., SUTTON R.A.L. et WATSON L. -

1967 : Urinary excretion of Mg in patients with calcium containing renal stones.

Lancet, 2, 958-960.

FAYET M.T. Melle -

1967 : Augmentation du pouvoir infectant de l'acide ribonucléique du virus de la fièvre aphteuse par addition de diéthylamino-éthyl-dextran.

Compte-Rendus, 264, 783-784.

FEATHERSTONE R.M. et MUEHLBAECHER C.A. -

1963 : The current role of inert gases in the search for anesthesia mechanisms.

Pharmacol. Rev., 15, 97-121.

FEATHERSTONE R.M., MUEHLBAECHER C.A., DE BON F.L. et FORSAITH J.A. -

1961 : Interactions of inert anesthetic gases with proteins.

Anesthesiology, 22, 977-981.

FILLIASTRE J.P., MIGNON F., SRAER J.D., MOREL-MAROGER L. et RICHET G. -

1967 : Insuffisance rénale aiguë réversible après traitement prolongé par le Dextran.

Presse Méd., 75, 2535-2538.

FINN A.L. et WELT L.G. -

1967 : Urea excretion in the potassium deficient Rat.

Proc. Soc. Expl. Biol. Med., 124, 724-728.

FISHER E.R. -

1964 : Hyaline droplets of renal tubular and glomerular epithelium : observations concerning their nature and derivation.

Expl. Mol. Path., 3, 304-319.

FLEISCHER W. et FRÖHLICH E. -

1965 : L'eau et les électrolytes dans l'organisme.

Masson, Paris, 1 vol., 451 p.

FLETCHER F., MARTIN L.E. et RATCLIFFE A.H. -

1952 : Interaction of macromolecules and fibrinogen.

Nature, 170, 319.

FORDTRAN J.S., RECTOR F.C., EWTON M.F., SOTER N. et KINNEY J. -

1965 : Permeability characteristics of the human small intestine.

J. Clin. Invest., 44, 1935-1944.

FOREMAN H. -

1955 : Chelating agents.

Ind. Med. and Surg., 24, 287-292.

FOREMAN H. et TRUJILLO T.T. -

1954 : The metabolism of ^{14}C -labeled ethylenediamine tetraacetic acid in human beings.

J. Lab. Clin. Med., 43, 566-571.

FORSTER R.P. -

1961 : Kidney cells.

In BRACHET J. et MIRSKY A.E., The Cell, vol. V, p. 89-161.

FRANK H.P. et LEVY G.B. -

1952 : Determination of molecular weight of polyvinylpyrrolidone.

J. Polymer. Sci., 10, 371-378.

FRANKS F. -

1965 : Hydrophobic hydration and the effect of hydrogen bonding solutes on the structure of water.

Ann. N.Y., Ac. Sci., 125, 277-289.

FRANKS F. -

1968 : Effects of solutes and surfaces on the structural properties of liquid water.

In BOLIS L. et PETHICA B.A., Membrane models and the formation of biological membranes, North Holland Pub. Cy., Amsterdam, p. 43-51.

FRIEDMAN S.M. -

1962 : Measurement of sodium and potassium by glass electrodes.

Meth. Biochem. Anal., 10, 71-106.

FULGRAFF C., HENNE H.J., SPARWALD E. et HEIDENREICH O. -

1968 : Die wirkung von calciumionen auf die glomeruläre filtrations rate und die elektrolyt und wasserausscheidung von intacten und isoliert perfundierten rattenieren.

Arch. Int. Pharmacodyn., 172, 49-61.

GABE M., PELTIER M., SCHRAMM B. et RICHET G. -

1965 : Effet des variations du pH urinaire sur la substance fondamentale intertubulaire de la médullaire rénale du Rat albinos.

Comptes rendus, 261, 2745-2748.

GABLER O. -

1960 : Uber die transformation des Chondrioms bei Speicherung makromolecular Stoffe (Dextran, Periston).

Virchow's Arch., 333, 230-240.

GALLE P. -

1964 : Oxalose rénale expérimentale. Etude au microscope électronique et par spectrographie des rayons X.

Néphron, 1, 158-171.

GALLE P. -

1965 : Nouvelle méthode d'analyse des incrustations minérales du rein.

Actual. Néphr. de l'Hôp. Necker, Flammarion, Paris, 1 vol., 193-206.

GALLE P. -

1967 : Les néphrocalcinoses : nouvelles données d'ultrastructure et de micro-analyse.

Act. Néphr. de l'Hôp. Necker, Flammarion, Paris, 1 vol., 303-315.

GARTNER K., VOGEL G. et ULBRICH M. -

1968 : Untersuchungen zur Penetration von Makromolekülen (Polyvinylpyrrolidon) durch glomeruläre und postglomeruläre Capillaren in den Harn und die Nierenlymphe und zur grosse der extravasalen Umwälzung von J. Albumin im Interstitium der Niere.

Pflügers Archiv., 298, 305-321.

GARY BOBO C.M. -

1967 : Non solvent water in human erythrocytes and hemoglobin solutions.

J. Gen. Physiol., 50, 2547-2564.

GASSER H.S. et ERLANGER J. -

1929 : Role of fiber size in establishment of nerve block by pressure or cocaine.

Amer. J. Physiol., 88, 581-591.

GAUDIANO A., TARTARINI S., GHIO M.T. et PETTI G. -

1967 : Ricerche biochimiche sulle modificazioni nel fegato di ratti trattati per via parenterale con sostanze macromolecolari non fisiologiche :

I. Comportamento di alcuni enzimi epatici in seguito a trattamento con destrano.

Boll. Soc. It. Biol. Sper., 43, 678-682.

2. Comportamento di alcuni enzimi epatici in seguito a trattamento con destrano e clorpromazine.

Boll. Soc. It. Biol. Sper., 43, 682-685.

GERARD R.W. -

1946 : Nerve metabolism and function. A critique of the role of acetylcholine.

Ann. N.Y. Ac. Sci., 47, 575-600.

GIROMINI M., JUNGERS P. et DUCROT H. -

1967 : Anurie provoquée par la perfusion de Dextran de faible poids moléculaire.

La Presse Méd., 1967, 75, 2561-2562.

GIROUD J.P. et SCHMITT H. -

1968 : Données actuelles sur la pharmacologie des diurétiques.

Thérapie, 23, 261-327.

GLAUSER S.C. et TALBOT T.R. -

1956 : Some studies on freezing and thawing human erythrocytes.

Amer. J. Med. Sci., 231, 75-81.

GONELIA J.,

1967 : Etude électrophysiologique de la motricité intestinale.

Thèse Doct. Sci., Aix-Marseille, 1 vol., ron., 145 p.

GOOD W. -

1961 : The haemolysis of human erythrocytes in relation to the lattice structure of water.

II. The effects of electrolytes on malonamide haemolysis.

Biochim. Biophys. Acta, 48, 229-241.

GOODMAN L.S. et GILMAN A. -

1965 : The pharmacological basis of therapeutics.

Macmillan Cy, 3è édit., 1 vol., 1785 p.

GUILLOT M. et FIEHRER A. -

1947 : Influence de la solution de PVP sur la vitesse de sédimentation sanguine.

Paris Médical, n° 26, 28-6.

GRAHAM R.C. -

1966 : Glomerular permeability. Ultrastructural cytochemical studies using peroxydases as protein tracers.

J. Exper. Med., 124, 1123-1126.

GREENFIELD I. -

1957 : Polyvinylpyrrolidone, its manufacture, properties and use in cosmetics.

J. Soc. Socm. Chem., 8, 196-211.

GREGERSEN M.I., PERIC B., USAMI S. et CHIEN S. -

1963 : Relation between molecular size of Dextran and its effects on rheologic properties of blood.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 112, 883-887.

GREGOIRE F. et GEPTS W. -

1967 : Altérations enzymatiques glomérulaires et tubulaires observées dans le syndrome néphrotique.

Act. Néphr. Hôp. Necker, Flammarion, p. 339-357.

GREMY F. et PAGES J.C. -

1962 : Aspects physiques des phénomènes osmotiques en biologie et en clinique.

Rev. Fr. Et. Clin. Biol., 7, 648-660.

GRIFFIN W.C. -

1949 : Classification of surface active agents by H L B.

S. Soc. Cosm. Chem., 1, 311-326.

GRIFFIN W.C. -

1954 : Calculation of H L B values of non ionic surfactants.

J. Soc. Cosm. Chem., 5, 249-256.

GRONVALL A. -

1957 : Dextran and its use in colloidal infusion solutions.

Almqvist et Wiksell, Edit., Stockholm.

HARDOUIN J.P. et AUBRION J. -

1959 : Etude expérimentale et clinique d'un nouvel agent thérapeutique de la constipation : le polymère de polyoxyéthylène et de polyoxypropylène.

Presse Méd., 67, 1548-1550.

HATT P.Y. -

1967 : The juxtaglomerular apparatus.

In : Ultrastructure of the kidney.

DALTON A.J. et HAGUENAU F. Acad. Press, 101-141.

HECHT G. -

1955 : Über den Mechanismus der Kollidonausscheidung der Niere.

Arch. Exp. Path. Pharmak., 226, 46-61.

HECKNER F. et GEHLMANN F. -

1955 : Cytologische beobachtungen zur Kollidon-speicherung.

Klin. Wschr., 17-18, 448-449.

HEINBECKER P. et BARTLEY S.H. -

1940 : Action of ether and nembutal on the nervous system.

J. Neurophysiol., 3, 219-236.

HERS H.G. -

1965a : Les maladies lysosomiales congénitales.

Rev. Intern. Hépatol., 15, 475-480.

HERS H.G. -

1965b : Inborn lysosomal diseases.

Gastroenterology, 48, 625-633.

HOLLANDE E. -

1969 : Formation des hétérolysosomes et des cytolysosomes dans les glandes multifides d'Hélix Pomatia (L) : étude ultrastructurale du processus de réabsorption de glycoprotéines.

Comptes Rendus, 268, 341-344.

HONJIN R. et NAKAMURA T. -

1967 : A refinement of the values of the lattice parameters in the crystal structure of amphibian fresh yolk platelets by X ray cristallography.

J. Ultrastr. Res., 20, 400-409.

HOOGHWINKEL G.J.M., DE ROOIJ R.E. et DANKMEIJER H.R. -

1965 : The mechanism of hemolysis by various types of surfactants.

Acta Physiol. Pharmacol. Neerl., 13, 304-316.

HOUDRY J. -

1968 : Données cytologiques et cytochimiques sur l'évolution des lysosomes.

L'Année Biologique, 7, 485-512.

HUEPER W.C. -

1956 : Polyvinylpyrrolidone, a cancerigenic agent for rats.

Proc. Amer. Ass. Cancer Res., 2, 120-123.

HUGGINS C.E. -

1963 : Prevention of hemolysis of large volumes of red blood cells slowly frozen and thawed in the presence of dimethylsulfoxyde.

Transfusion, U.S.A., 3, 483-493.

HUMMEL K. et SCHMIDT P. -

1967 : Wirkung wasserlöslicher makromolekularer Verbindungen auf native und mit Antikörpern sensibilisierte rote Blutzellen. I Mitteilung : Untersuchungen an Kolloidalen Infusionslösungen und linigen Fraktionen der in diesen enthaltenen Polymeren.

Ztschr. für Immunitäts Frsch., 135, 164-187.

HUMMEL K. et WENIGER J. -

1967 : Wirkung wasserlöslicher makromolekularer Verbindungen auf native und mit Antikörpern sensibilisierte rote Blutzellen. 2 Mitteilung : Untersuchungen an verschiedenen hochmolekularen Chargen von Dextran, Polyäthylenglykol und Polyvinylpyrrolidon.

Ztschr. für Immunitäts Frsch., 135, 219-236.

HUNTER C.G., STEVENSON D.E. et CHAMBERS P.L. -

1967 : Acute and short-term oral toxicity in rats of RD 025, a propylene glycol-ethylene oxide copolymer.

Fd. Cosmet. Toxicol., 5, 195-199.

HYDEN S. -

1955 : A turbidometric method for the determination of higher polyethyleneglycols in biologic materials.

Ann. Roy. Agr. Coll., 22, 139-145.

INOUE F. et FRANK G.B. -

1962 : Action of procaine on frog skeletal muscle.

J. Pharm. Expl. Ther., 136, 190-196.

JACOBSON E.D., BRODY D.C., BROITMAN S.A. et FORDTRAN S. -

1963 : Validity of polyethyleneglycol in estimating intestinal water volume.

Gastroenterology, 44, 761-767.

JANIGAN D.T. et SANTAMARIA A. -

1961 : A histochemical study of swelling and vacuolation of proximal tubule cells in sucrose nephrosis in the rat.

Amer. J. Path., 39, 175-180.

JIRANEK L. -

1966 : Comparison of the protective effect of a number of substances in the preservation of Mammalian Tissue cultures by freezing.

Folia Biol. Praha., 12, 291-299.

JOHNSTON C.C. et PODSIADLY C.J. -

1967 : Oxidative enzyme content of kidneys from normal and amino-nucleoside nephrotic rats.

Proc. Soc. Expl. Biol. Med., 124, 988-991.

JOLY P. -

1961 : Contribution à l'étude toxicologique des surfactifs du groupe des alcoylphénols polyoxyéthylés.

Thèse Univ. Paris, Fac. Pharm., 1 vol., ron., 179 p.

JUDAH J.D. et AHMED K. -

1963 : Role of phosphoproteins in ion transport. Interactions of sodium with calcium and potassium in liver slices.

Biochim. Biophys. Acta, 71, 34-44.

KARNOVSKY M. J. -

1961 : Simple methods for "staining with lead" at high pH in electron microscopy.

J. Biophys. Biochem. Cytol., 11, 729-732.

KATCHALSKY A. -

1954 : Polyelectrolyte gels.

Progr. Biophys., 4, 1-59.

KATIC V. et KOBINGER W. -

1962 : Die Wirkung von parenteral verabreichtem Polyäthylen glykol (Makrogol) auf die Elektrolyt - Ausscheidung im Harn von Ratten.

Arzneim. Forsch., 12, 630-631.

KHOURI J. -

1948 : Physio-pathologie de l'acide oxalique chez l'Homme (diathèse oxalique).

Masson, Paris, 1 vol., 120 p.

KOENIG H. -

1963 : The autofluorescence of lysosomes; its value for the identification of lysosomal constituents.

J. Histochem, Cytochem., 11, 556-557.

KONDO T. et TOMIZAWA M. -

1968a : Release of lipids from Red Cell Membrane by surface active agents.

Chem. Pharm. Bull., 16, 738-740.

KONDO T. et TOMIZAWA M. -

1968b : Hemolysis by Nonionic surface active agents.

J. Pharm. Sci., 17, 1246-1248.

KRUYT H.R. et OVERBEECK J.Th. G. -

1961 : Initiation à la chimie physique, Masson, 1 vol., 236 p.

KURTZ S.M. et FELDMAN J.D. -

1962 : Experimental studies on the formation of the glomerular basement membrane.

J. Ultrastruct. Res., 6, 19-27.

LANGE N.A. -

1956 : Handbook of chemistry, 9è Ed., Handbook Publishers, Sandusky, 1 vol. 1969 p.

LANGER G.A. -

1968 : Ion fluxes cardiac excitation and contraction and their relation to myocardial contractility.

Physiol. Rev., 48, 709-757.

LANGERON L., PAGET M., NOLF V. et DURIEZ L. -

1949 : De l'influence de l'injection intraveineuse de polyvinyl-pyrrolidone en solution à 25 % sur le fonctionnement rénal.

Ann. Biol. Clin., 7, 221-225.

LASSITER W.E., GOTSCHALK C.W. et MYLLE M. -

1963 : Micropuncture study of renal tubular reabsorption of calcium in normal rodents.

Amer. J. Physiol., 204, 771-774.

LATTA H., MAUNSBACH A.B. et OSVALDO L. -

1967 : The fine structure of renal tubules in cortex and medulla
in : Ultrastructure of the kidney, DALTON A.J. et HAGUE-
NAU F., Acad. Press., 1-57.

LEAK L.V. et ROSEN V.J. -

1966 : Early ultrastructural alterations in proximal tubule cells after unilateral nephrectomy and X irradiation.

J. Ultrastr. Res., 15, 326-348.

LEAKE C.D. -

1967 : Biological actions of dimethylsulfoxide.

Ann. N.Y. Ac. Sci., 141, 1-671.

LEFAUX R. -

1952 : Toxicologie des matières plastiques et des composés macromoléculaires.

Masson, Paris, 1 vol., 144 p.

LEFAUX R. -

1964 : Chimie et toxicologie des matières plastiques.

C.F.E., Paris, 1 vol., 582 p.

LEFEBVRE DES NOETTES R.A. et GOUNELLE J.C. -

1962 : Action d'une macromolécule de synthèse sur les érythrocytes du sang circulant.

C.R. Soc. Biol., 156, 25-26.

LEGRAIN M., PRUNIER Ph., GUEDON J. et WAJCNER G. -

1966 : L'oxalose.

Rein et Foie, Maladies de la Nutrition, 9, 273-287.

LE HIR A. -

1966 : Les polyoxyéthylèneglycols, excipients pharmaceutiques.

Prod. et Prob. Pharm., 21, 262-273.

LESSHAFT Ch. T. et DE KAY H.G. -

1957 : A study of non ionic surfactants in a hydrophilic ointment base.

I. The screening procedure.

Drug Stand., 3, 45-51.

LESSHAFT Ch. T. et DE KAY H.G. -

1957 : A study of non ionic surfactants in a hydrophilic ointment base.

II. Their effect on water loss.

Drug Stand., 51-56.

LEVINS R.J. et IKEDA R.M. -

1965 : Direct potentiometric titration of polyethylene glycols and their derivatives with sodium tetra-phenylboron.

Anal. Chem., 37, 671-675.

LEVY G.B. et FERGUS D. -

1953 : Microdetermination of polyvinylpyrrolidone in aqueous solution and in body fluids.

Anal. Chem., 25, 1408-1410.

LICHTWITZ A., DE SEZE S., HIOCO D., MIRAVET L., LANHAM O. et PARLIER R. -

1963 : Diabète calcique : double syndrome d'hyperabsorption intestinale du Ca et d'insuffisance de sa résorption tubulaire.

Presse Méd., 71, 165-168.

LIN J.M., BENSLAY D.N., ENSMINGER P.W. et NASH J.F. -

1967 : Experimental production of diarrhea and its prevention

by malethamer in monkeys.

Arch. Int. Pharmacodyn., 169, 147-161.

LIN T.M., NASH J.F., ENSMINGER P.W. et BENSLAY D.N. -

1967 : Mechanism study of the action of malēthamer in staphylococcus ... enterotoxin induced diarrhea in monkeys.

Arch. Int. Pharmacodyn., 169, 162-176.

LING G.N. et OCHSENFELD M. -

1966 : Studies on ion accumulation in muscle cells.

J. Gen. Physiol., 49, 819-843.

LINSON L. -

1958 : Statistique appliquée à la biologie expérimentale.

Gauthier-Villars, Paris, 1 vol., 346 p.

LORENTE DE NO R. -

1944 : Effect of choline and acetylcholine chloride upon peripheral nerve fibers.

J. Cell. Comp. Physiol., 24, 85-97.

LORENTE DE NO R. -

1951 : On the effect of cocaine upon sodium deficient frog nerve.

J. Gen. Physiol., 35, 203-225.

LOVELOCK J.E. -

1953a : The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing.

Biochim. Biophys. Acta, 10, 414-426.

LOVELOCK J.E. -

1953b : The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing.

Biochim. Biophys. Acta, 11, 28-36.

LOVELOCK J.E. -

1954 : The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing.

Biochem. J., 56, 265-270.

LOWENTHAL W. -

1968 : Multiregressional analysis of the Griffin H.L.B. numbers for polyoxyethylene polyoxypropylene surfactants.

J. Pharm. Sci., 57, 514-515.

LUCARAIN C. -

1962 : Un dispositif semi-automatique pour la mesure des pressions osmotiques.

Rev. Fr. Et. Clin. Biol., 7, 213-215.

LUCY J.A. et GLAUERT A.M. -

1964 : Structure and assembly of macromolecular lipid complexes composed of globular micelles.

J. Mol. Biol., 8, 727-748.

LUNSTED L.G. -

1952 : High molecular weight polymer detergent compounds and method of making the same.

British Patent Specification n° 731 603 - 10 mars 1952.

MAC KENNIS H. Jr, TURNER R.A., TURNBULL L.B. et BOWMAN E.R. -

1962 : The excretion and metabolism of triethylene glycol.

Toxic. Appl. Pharmacol., 4, 411-431.

MAC VICKAR D.L. -

1949 : Enhancement of hemolytic activity of complement by polyethyleneglycols.

Proc. Soc. Expl. Biol. Med., 72, 384-385.

MAGNAN C. -

1961 : Traité de microscopie électronique.

Hermann, Paris, 2 vol., 1301 p.

MARCUS A.D., WETSTEIN E. et RUDERMANN M. -

1956 : Incompatibility of phenols with Pluronic.

J. Am. Pharm. Ass., Pract. Ed., 18, 453 et 472-473.

MAUNSBACH A.B. -

1966a : Observations on the segmentation of the proximal tubule in the rat kidney - Comparison of results from phase contrast, fluorescence and electron microscopy.

J. Ultrastr. Res., 16, 239-258.

MAUNSBACH A.B. -

1966b : Observations on the Ultrastructure and acid phosphatase activity of the cytoplasmic bodies in rat kidney proximal tubule cells, with a comment on their classification.

J. Ultrastr. Res., 16, 197-238.

MAUNSBACH A.B. -

1966c : Isolation and purification of acid phosphatase-containing autofluorescent granules from homogenates of rat kidney cortex.

J. Ultrastr. Res., 16, 13-34.

MAUNSBACH A.B. -

1966d : Absorption of ^{125}I -labeled homologous albumin by rat kidney proximal tubule cells - A study of microperfused single proximal tubules by electron microscopic autoradiography and histochemistry.

J. Ultrastr. Res., 15, 197-241.

MAUNSBACH A.B. -

1966e : Absorption of ferritin by rat kidney proximal tubule cells - Electron microscopic observations of the initial uptake phase in cells of microperfused single proximal tubules.

J. Ultrastr. Res., 16, 1-12.

MAUNSBACH A.B. -

1966f : Electron microscopic observations of cytoplasmic bodies with crystalline patterns in rat kidney proximal tubule cells.

J. Ultrastr. Res., 14, 167-189.

MAUNSBACH A.B. -

1966g : The influence of different fixatives and fixation methods on the ultrastructure of rat kidney proximal tubule cells.

I. Comparison of different perfusion fixation methods and of glutaraldehyde, formaldehyde and osmium tetroxide fixation.

J. Ultrastr. Res., 15, 242-282.

MAUNSBACH A.B. -

1966h : The influence of different fixatives and fixation methods on the ultrastructure of rat kidney proximal tubule cells.

II. Effects of varying osmolarity, ionic strength, buffer system and fixative concentration of glutaraldehyde solutions.

J. Ultrastr. Res., 15, 283-309.

MAUNSBACH A.B., MADDEN S.C. et LATTA H. -

1962 : Light and electron microscopic changes in proximal tubules of rats after administration of glucose, mannitol, sucrose or Dextran.

Lab. Invest., 11, 421-432.

MAUPIN B. -

1964 : La conservation du sang aux basses températures.

Rev. des Corps de Santé, 5, 675-692.

MAURER P.H. -

1956 : The antigenicity of polyvinylpyrrolidone.

J. Immunol., 77, 105-110.

MAY L., HINES M., WEINTRAUB M.A., SCUDDER J. et GRAFF S. -

1954 : Some physical-chemical properties of polyvinylpyrrolidone.

Surgery, 35, 191-196.

MEIJER A.E. et WILLIGHAGEN R.G. -

1961 : Augmentation de l'activité de la phosphatase acide et de la β -glycuronidase dans le foie et la rate de la Souris après administration intrapéritonéale de diverses substances macromoléculaires.

Biochem. Pharmacol., 8, 389-397.

MEYLER L. -

1960 : Side effects of drugs.

Excerpta Medica Foundation, 1 vol., 350 p.

MICHAELS B.S., WADDELL G.H., ZINNER D.D. et SIGEL M.M.

1966 : Viral inhibitory activity of polyvinylpyrrolidone.

Nature, G.B., 212, 101-102.

MICHIELSEN P. et CREEMERS J. -

1967 : The structure and function of the glomerular mesangium

In : Ultrastructure of the kidney, DALTON A.J. et HAGUENAU F., Acad. Press, 57-72.

MILLER S.L. -

1961 : A theory of gaseous anesthetics.

Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., 47, 1515-1524.

MILLER F. -

1961 : Lipoprotein granules in the cortical collecting tubules of mouse kidney.

J. Biophys. Biochem. Cytol., 9, 157-170.

MILLER F. et PALADE G.E. -

1964 : Lytic activities in renal protein absorption droplets. An electron microscopical cytochemical study.

J. Cell. Biol., 23, 519-552.

MILLIEZ P., LAGRUE G., LAUDAT Melle M.H., MEYER Ph. et MANOYLOVITCH P. -

1960 : L'acide glycuronique urinaire au cours des lithiases rénales calciques.

Path. Biol., 8, 1855-1859.

MILNER A.R. -

Effects of Dextran on the fibrocytes of mouse strain Earle L 929.

Brit. J. Cancer., 17, 149-152.

MOENS R.S. -

1965 : Le métabolisme de la bilirubine.

Presse Méd., 73, 2049-2053.

MOFFAT D.B. -

1967 : A new type of cell inclusion in the interstitial cells of the medulla of the rat kidney.

J. Microscopie, 6, 1073-1076.

MONNERIE L. et NEEL J. -

1963 : Marquage de macromolécules par substitution de leurs groupements terminaux par des réactifs chromogènes.

Comptes-Rendus, 256, 1528-1530.

MORARD J.C. et ABADIE A. -

1968 : Fonction des mucopolysaccharides et des mucoïdes acides de la médullaire rénale dans l'élaboration de l'urine. II. Etudes histochimiques au cours de diurèses contrôlées.

J. Physiol., Paris, 60, 323-356.

MORARD J.C. et POIRIER M.F. -

1968 : Fonction des mucopolysaccharides et des mucoïdes acides de la médullaire rénale dans l'élaboration de l'urine.

- I. Etudes histochimiques au cours de la diurèse normale.
J. Physiol., Paris, 60, 297-321.

MORGAN D.J. -

- 1962 : The micro determination of non ionic surface active agents containing polyethylene-oxyde linkages.
Analyst., 3, 233-234.

MORGAN T.O., LITTLE J.M. et EVANS W.A. -

- 1966 : Renal failure associated with low-molecular weight Dextran infusion.
Brit. Med. J., 11, 737-739.

MORRISON A.B., PANNER B. et GASIC G. -

- 1963 : Lysosomes in the renal papillae of rats : formation induced by potassium deficient diet.
Science, 142, 1066-1067.

MURAT M. -

- 1945 : Etude de certaines propriétés chimiques, pharmacodynamiques et pharmacologiques de la polyvinylpyrrolidone.
Impr. M. Declume, Lons le Saulnier, 86 p.

MURAT M. -

- 1949 : Etude de certaines propriétés chimiques et pharmacodynamiques de la polyvinylpyrrolidone.
Prod. Pharm., 4, 350-356.

NEUSTEIN H.B. -

- 1967 : Hemoglobin absorption in the proximal tubules of the kidney in the rabbit.
J. Ultrastr. Res., 17, 565-587.

NEUSTEIN H.B. et MAUNSBACH A.B. -

- 1966 : Hemoglobin absorption by proximal tubule cells of the rabbit kidney. A study by electron microscopic autoradiography.
J. Ultrastr. Res., 16, 141-157.

NEVILLE J. et SWAFFORD S. -

- 1960 : Pluronics as a suppository base.
Am. J. Pharmacy, 132, 301-303.

NOVIKOFF -

1961 : Lysosomes and related particles in the cell.

In : "The Cell", BRACHET J. et MIRSKY A.E., Ac. Press, New York, vol. II, p. 423-488.

OSLET J. -

1963 : Quelques incompatibilités des excipients pour pommades.

J. Pharm. Belgique, 18, 121-134.

OSVALDO L. et LATTA H. -

1966 : The thin limb of the loop of Henle.

J. Ultrastr. Res., 15, 144-168.

OSVALDO L. et LATTA H. -

1966 : Interstitial cells of renal medulla.

J. Ultrastr. Res., 15, 589-613.

OWE BERG T.G. -

1965 : Bonds in water and aqueous solutions.

Ann. N.Y. Ac. Sci., 125, 298-316.

PACIFICO C.R., LUNDSTED L.G. et VAUGHN T.H. -

1950 : Flake form non ionic.

Soap and Sanitary Chemicals, 26, 40-43.

PAGANELLI C.B. et SOLOMON A.K. -

1957 : The rate of exchange of tritiated water across the human red cell membrane.

J. Gen Physiol., 41, 259-277.

PARKINSON T.M. -

1967 : Metabolism of orally administered Dextran and Sephadex derivatives in the Rat.

Nature G.B., 215, 415-416.

PASSOW H. -

1964 : Ion and water permeability of the red blood cell.

In : BISHOP C. et SURGENOR D.M., The Red Blood Cell, Acad. Press, 1 vol., 566 p.

PAULING L. -

1961 : A molecular theory of general anesthesia.

Science, 134, n° 3741, 15-21.

PEASE D.C.

1955 : Electron microscopy of the tubule cells of the kidney cortex.

Anat. Record., 121, 723-743.

PERRAULT M., TRUHAUT R., KLOTZ B., BOUDENE C.,
DREUX C., CLAVEL B. et CHAIN F. -

1956 : Sur l'efficacité de l'E.D.T.A. calcique dans l'intoxication saturnine professionnelle.

Arch. Mal. Prof., 17, 423-429.

PHILIPPOT J. -

1962 : Contribution à l'étude physico-chimique des échanges globulo-plasmatiques.

Thèse Doct. Sci., Paris, 1 vol., ron., 103 p.

PIETTE M. et PIETTE C. -

1959 : Modifications leucocytaires du sang du Lapin après injection intraveineuse d'un libérateur d'histamine.

Comptes Rendus, 248, 1049-1052.

POBEGUIN Melle T. -

1943 : Description sommaire des hydrates d'oxalate de calcium.

Comptes Rendus, 216, 500-501.

POLICARD A. -

1968 : A propos de la matrice cytoplasmique fondamentale, phase continue soluble de la cellule.

Rev. Fr. Et. Clin. Biol., 13, 839-844.

POLICARD A., COLLET A., DANIEL MOUSSARD H. et
PREGERMAIN S. -

1960 : Sur les premiers stades des altérations expérimentales du rein par l'acide silicique. Etude au microscope électronique.

J. Urol., 66, 585-600.

POLGE C., SMITH A.V. et PARKES A. -

1949 : Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures.

Nature, 164, 666.

PONDER E. -

1948 : Hemolysis and related phenomena.

Grune et Stratton, N.Y., 1 vol., 398 p.

QUEVAUVILLER A. -

1962 : La patho-pharmacodynamie.

Presse Méd., 70, 923.

RAMMLER D.H. -

1967 : The effect of D.M.S.O. on several enzyme systems.

Ann. N.Y. Ac. Sci., 141, 291-299.

REYNOLDS E.S. -

1963 : The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy.

J. Cell. Biol., 17, 208-213.

RHODIN J.A. -

1958 : Anatomy of kidney tubules.

In : International Review of Cytology, BOURNE G.G. et DANIELLI J.G., vol. VIII, 485-534.

RHODIN J.A. -

1962 : Electron microscopy of the kidney.

In : Renal disease, D.A. BLACK, Davis, Philadelphie, Pennsylv., 117-156.

RICHTER G.W. -

1957 : A study of hemosiderosis with the aid of electron microscopy, with observations on the relationship between hemosiderin and ferritin.

J. Expl. Med., 106, 203-218.

RIEGELMAN S. -

1960 : The effect of surfactants on Drug stability.

J. Am. Pharm. Ass., Sci. Ed., 49, 339-343.

ROCHAT J., GUILLOT B., VERAÏN A. et DEBELMAS Mme -

1967 : Activité antispasmodique de quelques surfactifs non ioniques.

Bull. Trav. Soc. Pharm. Lyon, 2, 27-36.

ROODYN D.B. -

1967 : Enzyme cytology.
Acad. Press, 1 vol., 587 p.

ROSENTHALER L. -

1961 : Zur Kenntnis der Polyoxyaethylenglykole.
Pharmaz. Zg., 106, 821-822.

ROUILLER Ch., PICTET R., NICOLESCU P. et ORCI L. -

1967 : Les cellules réticulo-endothéliales du foie et l'espace de Disse.
Rev. Int. Hépatol., 17, 827-854.

ROWLATT C. -

1968 : Unusual inclusions found in lysosomes of mouse coagulating gland epithelium.
J. Ultrastr. Res., 22, 393-401.

ROWLEY D.A., FITCH F.W. et BYE I.J. -

1962 : Anemia produced in the Rat by methylcellulose.
I. Repeated intraperitoneal injections of methylcellulose.
Arch. Path., 74, 331-339.

ROZE C. -

1964a : Technologie pharmacologique. Un dispositif simple de régulation de température centrale pour petits animaux.
Prod. et Prob. Pharm., 19, 347-349.

ROZE C. -

1964b : Les sécrétions pancréatique et biliaire du Rat. Etude expérimentale. Application à l'essai de quelques hormones gastro-intestinales.
Thèse Doct. Etat, Méd., Paris, 1 vol., ron., 248 p.

ROZE C. -

1966 : Comportement osmotique des hématies dans des solutions d'un détergent non ionique : le Pluronic F-68.
Comptes Rendus, 263, 1615-1618.

ROZE C. -

1968a : Comportement osmotique des hématies dans des solutions de 3 polymères hydrophiles : polyoxyéthylèneglycol 6000,

polyvinylpyrrolidone 11.000 et Pluronic F-68.

Comptes Rendus, 266, 506-508.

ROZE C. -

1968b : Action d'un polymère hydrophile, le polyoxyéthylène-glycol 6000, sur l'oxalose rénale expérimentale chez le Rat.

Comptes Rendus, 266, 694-696.

ROZE C. -

1969 : Etablissement d'un programme de calcul sur ordinateur pour l'analyse factorielle 2x2. Application à l'étude de la relation entre le poids corporel et le poids de quelques organes chez le Rat Wistar C.F.

A paraître.

ROZE C., CHARIOT J. et JEUNEMAITRE M. -

1968 : Emploi d'un capteur de déplacements angulaires pour la myographie isotonique.

J. Physiol., 60, 449-453.

ROZE C. et MARTIN E. -

1968 : Infrastructure du rein après administration de polymères hydrophiles, chez le Rat normal et lithiasique.

Comptes Rendus, 266, 1758-1760.

SALACH J.I. et GERSHBEIN L.L. -

1968 : Action of polyethyleneglycol on smooth muscle contractility induced by histamine and cholecystokinin concentrates.

Arch. Int. Pharmacodyn., 172, 323-327.

SAMS W.M. Jr -

1967 : The effects of dimethylsulfoxide on nerve conduction.

Ann. N.Y. Ac. Sci., 141, 242-247.

SAMS W.M. Jr, CARROLL N.V. et CRANTZ P.L. -

1966 : The effect of dimethylsulfoxide on isolated innervated skeletal, smooth and cardiac muscle.

Proc. Soc. Expl. Biol. Med., 122, 103-106.

SASKI W. et SHAH S.G. -

1965 : Availability of Drugs in the presence of Surface Active Agents.

1. Critical micelle concentrations of some Oxyethylene Oxypropylene Polymers.

J. Pharm. Sci., 54, 71-74.

SAUNDERS J.F. et FLYNN J.E. -

1965 : Forms of water in biologic systems.

Ann. N.Y. Ac. Sci., 125, 249-772.

SCHEDL H.P., MILLER D. et WHITE D. -

1966 : Use of polyethyleneglycol and phenol red as unabsorbed indicators for intestinal absorption in man.

Gut , 7, 159-163.

SCHERAGA H.A. -

1965 : The effect of solutes on the structure of water and its implications for protein structure.

Ann. N.Y. Ac. Sci., 125, 253-276.

SCHMITT F.O. -

1960 : Fast fundamental transfer processes in aqueous biomolecular systems .

Department of Biology, M.I.T., Cambridge, Mass.,
1 fasc., 56 p.

SCHMUTZLER W., HEIDENREICH O., HAHN F., LAAFF K.,
LAAFF H., GIERTZ H. et BAUMEISTER L. -

1966 : Die Wirkung von Periston N bei Ratten mit experimentell erzeugten Nierenschädigungen.

Arch. Exp. Pathol. Pharmacol., 255, 419-441.

SCHNEEBERGER E.E. et MORRISSON A.B. -

1965 : The nephropathy of experimental magnesium deficiency. Light and electron microscopic investigations.

Lab. Invest., 14, 674-686.

SCHOEN H. -

1949 : Organveränderungen beim Säugling nach Zufuhr von periston.

Klin. Wschr., 27, 463-468.

SCHULTE K.E. et KASSEM M.A. -

1963 : Rheologische Studien an Salbengelen.

5. Mitteilung : Untersuchungen am Polyäthylenglycol-gel des 3 Nachtr. DAB 6.

Pharm. Acta Helv., 39, 77-87.

SCHULZE E. et LOWE H. -

1967 : Speicherung von Dextran in Leber und Milz der Ratte bei chronischer Applikation und ihr Einfluss auf Teilfunktionen dieser Organe.

Acta Biol. Med. German., 18, 517-527.

SCHWAN H.P. -

1965 : Electrical properties of bound water.

Ann. N.Y. Ac. Sci., 125, 344-354.

SEILLER Mme M. et DUCHENE Melle D. -

1968 : Etude de l'enrobage rapide aux polyoxyéthylène-glycols

Ann. Ph. Fr., 26, 291-300.

SHAFFER C.B. et CRITCHFIELD F.H. -

1947a : Solid polyethyleneglycols (Carbowax compounds). Quantitative determination in biological materials.

Anal. Chem., 19, 32-34.

SHAFFER C.B. et CRITCHFIELD F.H. -

1947b : The absorption and excretion of the solid polyethyleneglycols (Carbowax compounds).

J. Am. Pharm. Ass., Sci. Ed., 36, 152-157.

SHAFFER C.B., CRITCHFIELD F.H. et CARPENTER C.P. -

Renal excretion and volume distribution of some polyethyleneglycols in the dog.

Am. J. Physiol., 152, 93-99.

SHAFFER C.B., CRITCHFIELD F.H. et NAIR J.H. -

1950 : The absorption and excretion of a liquid polyethylene glycol.

J. Am. Pharm. Ass., Sci. Ed., 39, 340-44.

SHAFFER C.B., CRITCHFIELD F.H. et NAIR J.H. -

1950 : Chemical and physical examination of some polyethyleneglycols.

J. Am. Pharm. Ass., Sci. Ed., 39, 344-348.

SHELANSKI H.A., SHELANSKI M.V. et CANTOR A. -

1954 : Polyvinylpyrrolidone. A useful adjunct in cosmetics.

J. Soc. Cosm. Chem., 5, 129-132.

SHNITKA T. -

1966 : Comparative ultrastructure of hepatic microbodies in some mammals and birds in relation to species differences in uricase activity.

J. Ultrastr. Res., 16, 598-625.

SIDEL V.W. et SOLOMON A.K. -

1957 : Entrance of water into human red cells under an osmotic pressure gradient.

J. Gen. Physiol., 41, 243-257.

SILVA D.G. -

1967 : The ultrastructure of crystal containing cells in the colonic epithelium of mice.

J. Ultrastr. Res., 18, 127-141.

SIMON E. -

1958 : Les substituts du plasma humain.

Anesth. Analg. Réanim., 15, 681-780.

SJÖSTRAND F. -

1944 : Über die Eigenfluoreszenz tierischer gewebe mit besonderer Berücksichtigung der Säugetierniere.

Acta Anat., Suppl. 1, 163 p.

SLOVITER H.A. et RAVDIN R.G. -

1962 : Recovery and transfusion of human erythrocytes after freezing in polyglycol solutions.

Nature, 196, 899-900.

SMYTH H., CARPENTER C.P. et SHAFFER C.B. -

1945 : The subacute toxicity of polyethylene glycols of approximate weights of 200, 300 and 400.

J. Am. Pharm. Ass., Sc. Ed., 34, 172-175.

SMYTH H.F., CARPENTER C.P. et SHAFFER C.B. -

1947 : The toxicity of high molecular weight polyethyleneglycols ; chronic oral and parenteral administration.

J. Am. Pharm. Ass., Sci. Ed., 36, 157-162.

SMYTH H.F., CARPENTER C.P. et WEIL C.S. -

1950 : The toxicology of the polyethyleneglycols.

J. Am. Pharm. Ass., Sci. Ed., 39, 349-354.

SMYTH H.F., CARPENTER C.P. et SHAFFER C.B. -

1954 : The subacute toxicity and irritation of polyethyleneglycols 200, 300 and 400.

J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed., 24, 162-166.

SMYTH H.F., CARPENTER C.P. et WEIL C.S. -

1955 : The chronic oral toxicology of the polyethyleneglycols.

J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed., 44, 27-30.

SPENCER H. -

1960 : Studies of the effect of chelating agents in man.

Ann. N.Y. Ac. Sci., 88, 435-449.

SPERBER I. -

1963 : Biliary excretion and choleresis.

In : Proc. of the 1st International Pharmacological Meeting, vol. 4, Drugs and membranes, Pergamon Press, London, p. 137-143.

SPERBER I. -

1965 : Biliary secretion of organic anions and its influence on bile flow.

In : TAYLOR W., The biliary system, Blackwell, Oxford, p. 457-467.

STEINMANN J.M. -

1967 : Anesthésie différentielle de fibres A alpha motrices et sensorielles de la grenouille.

J. Physiol., Paris, 59, 175-186.

STRAUS W. -

1954 : Isolation and biochemical properties of droplets from the cells of the rat kidney.

J. Biol. Chem., 207, 745-749.

STRAUS W. -

1957 : Segregation of an intravenously injected protein by droplets of the cells of rat kidneys.

J. Biophys. Biochem. Cytol., 3, 1037-1049.

STRAUS W. -

1964a : Cytochemical observations on the relationship between lysosomes and phagosomes in kidney and liver by combined staining for acid phosphatase and intravenously injected horseradish peroxidase.

J. Cell. Biol., 20, 497-507.

STRAUS W. -

1964b : Occurrence of phagosomes and phago-lysosomes in different segments of the nephron in relation to the reabsorption, transport, digestion and extrusion of intravenously injected horseradish peroxidase.

J. Cell. Biol., 21, 295-308.

STRAUS W. -

1967 : Lysosomes, phagosomes and related particles.

In : Enzyme cytology, ROODYN C.B., Acad. Press, 239-319.

SUTHERLAND E.W., OYE I., BUCHTER R.W. -

1965 : The action of epinephrine and the role of the adenylyl cyclase system in hormon action.

Rec. Prog. Horm. Res., 21, 623-646.

SUZUKI T. et MOSTOFI F.K. -

1967 : Intramitochondrial filamentous bodies in the thick limb of Henlé of the rat kidney.

J. Cell. Biol., 33, 605-623.

SWANSON E.E., ANDERSON R.C., HARRIS P.N. et ROSE C.L.

1953 : The activity and toxicity of ampules amytal sodium and seconal sodium in aqueous polyethyleneglycol 200.

J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed., 43, 571.

TABORSKY J., EFENDIC S. et IVANCEVIC I. -

1962 : Action de la 1 oxo 3(3'sulfamoyl 4'chlorophenyl) 3 hydroxy isindoline sur l'oligurie provoquée par le Dextran chez le Rat (en Serbo-Croate).

Acta Pharm. Jugosl., 12, 147-151.

TALBOT T.R. et GLAUSER S.E. -

1955 : Prevention of hemolysis of human erythrocytes due to freezing and thawing by compounds of high molecular weight.

Clin. Res. Proc., 3, 8.

TANRET P., THOMAS J. et COTTENOT F. -

1961 : Evolution des dépôts oxaliques et lipotidiques au cours de la lithiase rénale expérimentale par l'éthylène-glycol et l'acide oxalique.

C.R. Soc. Biol., 155, 1025-1027.

TANRET P., THOMAS J., THOMAS E. et COTTENOT F. -

1962 : Influence du sexe sur la formation de dépôts d'oxalate de calcium dans les reins chez le Rat intoxiqué par l'éthylène-glycol.

C.R. Soc. Biol., 156, 1285-1287.

TATA J.R. -

1960 : Biochemical applications of a newly discovered property of thyroxine.

Ann. N.Y. Ac. Sci., 86, 469-483.

TAYLOR W. -

1965 : The biliary system.

Blackwell, Oxford, 1 vol., 712 p.

THOMAS J. André -

1947 : La survie d'organites non stériles en milieu antiseptique et nutritif comme procédé d'analyse morphogénétique.

Comptes Rendus, 225, 148-151.

THOMAS J. André -

1963 : Introduction à l'étude de la survie : Cellules - organes - organismes.

In : J. André THOMAS, Survie et conservation biologique, Exp. Act. Biol. Cell., 1962, Masson, 1 vol., p. 1-160.

THOMAS J., ROUJEAU J. et ABOULKER P. -

1962 : Tissu osseux et lithiase rénale - Etude anatomique -

Rein et Foie, Mal. de la Nutrition, 4, IV-1 à IV-20.

THROWER W.R. et CAMPBELL H. -

1951 : Plasmosan ; a synthetic substitute for plasma.

Lancet, 1, 1096-1099.

TOMAN J.E.P. -

1952 : Neuropharmacology of peripheral nerve.

Pharmacol. Rev., 4, 168-218.

TORMEY J.M. et DIAMOND J.M. -

1967 : The ultrastructural route of fluid transport in rabbit gall bladder.

J. Gen. Physiol., 50, 2031-2034.

TRAEGER J. -

1965 : Les diurétiques osmotiques.

Rev. du Praticien, 15, 132-135.

TREMBLAY A. et DUFOUR D. -

1966 : Etude immunopathologique de la lithiase rénale du Rat à l'éthylène-glycol.

Pathol. Biol., 14, 1048-52.

TRINER L. et MRÄZ M. -

1963 : Some biochemical changes in the blood after dextrane administration.

Physiol. Bohemoslov., 12, 128-135.

TRINSCHER K.S. -

1964 : Ueber die negative entropie des intracellulären Wassers im Erythrocyten.

Biochim. Biophys. Acta, 88, 438-439.

TRUMP B.F. -

1961 : An electron microscope study of the uptake, transport and storage of colloidal materials by cells of the vertebrate nephron.

J. Ultrastr. Res., 5, 291-297.

TRUMP B.F. et JANIGAN D.T. -

1962 : The pathogenesis of cytologic vacuolisation in sucrose nephrosis. An electron microscopic and histochemical study.

Lab. Invest., 11, 395-411.

VAILLE C., DEBRAY C., MARTIN E., Melle SOUCHARD M. et ROZE C. -

1962 : Danger de l'emploi par voie parentérale de certaines macromolécules.

Ann. Pharm. Fr., 20, 409-419.

VAILLE C., DEBRAY C., MARTIN E., Melle SOUCHARD M. et ROZE C. -

1963 : Sur la lithiase rénale expérimentale à l'éthylène-glycol chez le Rat mâle et femelle.

Ann. Pharm. Fr., 21, 111-116.

VAILLE C., DEBRAY C., MARTIN E., Melle SOUCHARD M. et ROZE C. -

1964 : Nature des concrétions rénales dans la lithiase expérimentale à l'éthylène-glycol chez le Rat.

Ann. Pharm. Fr., 22, 59-67.

VAILLE C., ROZE C., et Melle SOUCHARD M. -

1964a : Contribution à l'étude du rôle de la gélification dans la lithiase.

Ann. Pharm. Fr., 22, 275-280.

VAILLE C., ROZE C. et Melle SOUCHARD M. -

1964b : Le pharmacologue doit-il exprimer les doses en fonction du poids corporel ? Exemple du déhydrocholate de sodium.

Prod. et Prob. Pharm., 19, 103-109.

VAILLE C. et Melle SOUCHARD M. -

1965 : A propos de l'isotonie des solutés injectables.

Ann. Pharm. Fr., 23, 323-330.

VALERI C.R. -

1968 : Preservation of human red blood cells.

Bull. N.Y. Ac. Medicine, 44, 3 - 17.

VALETTE G. et ANGLADE-MARANDON Mme J. -

1954 : Actions comparées de la polyvinylpyrrolidone, du Dextran et du soluté isotonique de chlorure de sodium sur la vitesse de sédimentation des hématies.

Ann. Pharm. Fr., 12, 518-533.

VAN HOOFF F. et HERS H.G. -

1967 : L'ultrastructure du foie dans certaines thésaurismoses.

Rev. Int. Hépatol., 17, 815-826.

VAUGHN T.H., SUTER H.R., LUNDSTED L.G. et KRAMER M.G.
 1951 : Properties of some newly developed non ionic detergents
 J. Am. Oil Chem. Soc., 28, 294-299.

WALL P.D. et HORWITZ N.H. -

1951 : Observations on the physiological action of strychnine.
 J. Neurophysiol., 14, 257-263.

WALTER H. et COYLE R.P. -

1968 : Effect of membrane modification of human erythrocytes
 by enzyme treatment on their partition in aqueous dextran-poly-
 ethylene glycol two phase systems.

Biochim. Biophys. Acta, 165, 540-543.

WALTER H., KROB E.J. et GARZA R. -

1968 : Factors in the partition of red blood cells in aqueous
 dextran - polyethylene glycol two phase systems.

Biochim. Biophys. Acta, 165, 507-514.

WEISSMANN G. -

1968 : Effect on lysosomes of drugs useful in connective tissue
 disease.

In : P.N. CAMPBELL, The interaction of drugs and sub-
 cellular components in animal cells. J. et A. CHURCHILL,
 London, 1 vol., 203-217.

WEISSMANN G., SESSA G. et BEVANS V. -

1967 : Effect of DMSO on the stabilization of lysosomes by
 cortisone and chloroquine in vitro.

Ann. N.Y. Ac. Sc., 141, 326-332.

WHEELER H.O. et MANCUSI-UNGARO P.L. -

1966 : Role of bile ducts during secretin choleresis in dogs.

Am. J. Physiol., 210, 1153-1156.

WHEELER H.O., MANCUSI-UNGARO P.L. et WHITLOCK R.T. -

1960 : Bile salt transport in the dog.

J. Clin. Invest., 39, 1039-1041.

WHITTAM R. -

1964 : Transport and diffusion in red blood cells.

E. Arnold, London, 1 vol., 228 p.

WHITTEMBURY G., SUGINO N. et SOLOMON A.K. -

1960 : Effect of antidiuretic hormone and calcium on the equivalent pore radius of kidney slices from *Necturus*.

Nature, 187, 699-701.

WIEGERSHAUSEN B. et KUPKE D. -

1959 : Zur pharmakologie der Tweens.

1. Die wirkung von Tween 80 auf periphere gefassgebiete.

Acta Biol. Med. Germ., 1, 249-258.

WOLF A.V. -

1966 : Aqueous solutions and body fluids - Their concentrative properties and conversion tables.-

Hoeber Medical Division, Harper et Row, N.Y. et London, 1 vol., 166 p.

WYANDOTTE CHEMICALS CORPORATION -

1961 : Toxicity and irritation data on pluronic polyols.

un fasc., 10 p.

ZALOKAR M. -

1960 : Cytochemistry of centrifuged hyphae of *Neurospora*.

Expl. Cell. Res., 19, 114-132.

ZALOKAR M. -

1960 : Sites of protein and ribonucleic acid synthesis in the cell.

Expl. Cell. Res., 19, 559-576.

Vu et approuvé

.20. F. ~~vriar~~ 19. 69

n de la Faculté des Sciences
de Paris

arc. ZILINSKY

Vu
et permis d'imprimer

Le Recteur de l'Académie de Paris

Jean ROCHE

